

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und  
Tumorimmunologie der Charité, Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Dörken,  
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin,  
Robert-Rössle-Klinik am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

## DISSERTATION

# **Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene in B-Zellen und Charakterisierung des Genproduktes LAPTM5**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Hauke Schneider

aus Halle / Saale

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. B. Dörken
2. Prof. Dr. med. G. Riethmüller
3. PD Dr. med. F. Zipp

Datum der Promotion: 29.11.2002



*Meiner Familie: Anneliese, Helmut und Heiner*



## Zusammenfassung

Programmierter Zelltod (PCD) oder Apoptose ist ein universeller biologischer Prozess, der in multizellulären Organismen essentiell ist für die Differenzierung und Homöostase von Geweben. Bei der Entwicklung eines funktionsfähigen zellulären Immunsystems können autoreaktive Zellen entstehen. Die negative Selektion von unreifen, autoreaktiven B-Zellen erfolgt durch IgM-vermittelte Apoptose und ist von *de novo* Transkription abhängig. Die genauen Mechanismen der IgM-vermittelten Apoptose und die involvierten Genprodukte sind nur unzureichend charakterisiert. Zur Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene in B-Zellen wurde die Differential Display-Analyse durchgeführt und die Expressionsmuster apoptotischer und nicht-apoptotischer BL60-Zellen untersucht. Es wurden 38 differentielle Fragmente identifiziert und kloniert. Sequenzanalysen ergaben Homologien eines Fragments mit LAPTM5, einem lysosomal-assoziierten Transmembran-Protein mit vorwiegender Expression in hämatopoetischem Gewebe. Northern Blot-Analysen zeigten 2 Stunden nach Inkubation von BL-60-Zellen mit anti-IgM einen Anstieg der Genexpression von LAPTM5. Das LAPTM5-Gen liegt auf Chromosom 1 (1p34), ist evolutionär konserviert und besitzt keine Homologien zu bekannten Genen. Die Untersuchung der gewebespezifischen Expression von LAPTM5 ergab neben der hohen Expressionsrate in hämatopoetischem Gewebe eine sehr starke Expression in Skelett- und Herzmuskelgewebe. Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine Lokalisation des Proteins in späten Endosomen und Lysosomen. Daneben konnte LAPTM5 auch auf der Oberfläche von BL60-Zellen detektiert werden. Während des apoptotischen Prozesses bleibt die Menge an LAPTM5 auf der Zelloberfläche konstant. Zur weiteren Charakterisierung von LAPTM5 und anderen Kandidaten-Genen wurde ein episomales Expressions- und Selektionssystem entwickelt. Cotransfektionsanalysen unter Verwendung eines GFP (green fluorescent protein)-Konstrukts zeigten, dass die aufgereinigten Zellen zu 80% das interessierende Gen exprimieren und die Expression länger als vier Wochen anhält.

Schlagworte: Apoptose, B-Zellen, LAPTM5, Lysosomen, episomal

## Abstract

Programmed cell death (PCD) or apoptosis is a key feature of normal development and tissue homeostasis. In the development of a functional immunesystem the occurrence of autoreactive cells is tightly controlled and prevented by apoptosis. The negative selection of autoreactive immature B cells after encountering self antigen occurs via surface IgM (sIgM) mediated apoptosis and depends on *de novo* gene transcription. The precise mechanism of this process and the possible involvement of different genes in the regulation of sIgM-mediated cell death is not understood so far. In order to identify genes associated with B cell apoptosis Differential Display RT-PCR (DD) was performed to analyze sIgM-mediated apoptosis in the human Burkitt lymphoma line BL60. The expression patterns of apoptotic and non-apoptotic cells were investigated and 38 differentially expressed gene fragments were found. Subsequent northern blot analysis showed that LAPTM5, a lysosomal associated membrane protein preferentially expressed in adult hematopoietic tissue, is up-regulated 2 hours after induction of apoptosis. LAPTM5 is a protein with five transmembrane domains, it is conserved during evolution and the gene, mapping to chromosome 1p34, has no homology to known genes. In contrast to earlier data a very high expression of the protein was detected not only in hematopoietic tissue but also in skeletal muscle and heart muscle. Electronmicroscopy was performed to investigate the subcellular localization in detail and showed that LAPTM5 is mainly present in late endosomes and lysosomes. FACS analysis revealed a surface expression of LAPTM5 and a constant amount of LAPTM5 at the surface during IgM mediated apoptosis. To further investigate the functional role of candidate genes during apoptosis an episomal expression and selection system was established. Cotransfection analysis with GFP (green fluorescent protein) showed that 80% of the separated cells express the gene of interest for at least four weeks.

Keywords: Apoptosis, B cells, LAPTM5, Lysosomes, episomal

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINFÜHRUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 APOPTOSE – EIN UNIVERSELLER BIOLOGISCHER PROZESS .....	1
1.2 DIFFERENZIERUNG VON PHYSIOLOGISCHEM UND PATHOLOGISCHEM ZELLTOD .....	2
1.3 APOPTOSE: SIGNALTRANSDUKTION UND REGULATION .....	3
1.3.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose und Fas-/CD95-System .....	3
1.3.2 Caenorhabditis elegans und Drosophila melanogaster .....	5
1.3.3 Caspasen .....	6
1.3.3.1 Struktur und biologische Aktivität der Caspasen .....	8
1.3.3.2 Caspase-negative Mausmodelle .....	8
1.3.3.3 Aktivierung von Caspasen .....	9
1.3.3.4 Substrate der Caspasen .....	10
1.3.4 Die BCL2-Familie .....	11
1.3.5 Interaktion von Caspasen, Proteinen der BCL2-Familie und Mitochondrien .....	12
1.3.5.1 Mitochondrien als Mediatoren apoptotischer Signale .....	12
1.3.5.2 Caspase-aktivierte DNase und Abbau von DNA .....	15
1.4 APOPTOSE IN B-ZELLEN .....	15
1.4.1 B-Zell Differenzierung und IgM-vermittelte Apoptose in B-Zellen .....	15
1.5 GENEXPRESSION IM RAHMEN DES PROGRAMMIERTEN ZELLTODES .....	17
1.6 DAS LYSOSOMAL-ASSOZIIERTE PROTEIN LAPTM5 .....	17
1.7 VORARBEITEN .....	18
1.8 ZIELSTELLUNG .....	19
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1 MATERIAL .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Radioaktivität .....	20
2.1.3 Kits .....	20
2.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsmarker .....	21
2.1.5 Antikörper, immunologische Produkte .....	21
2.1.6 Zelllinien .....	21
2.1.7 Zellkulturmedien .....	22
2.1.8 Bakterienstämme .....	23
2.1.9 Bakterienkulturmedien .....	23
2.1.10 Vektoren .....	23

---

2.1.11	DNA-Oligonukleotide .....	24
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	24
2.1.13	Weitere Materialien .....	28
2.1.14	Geräte.....	29
2.2	METHODEN.....	30
2.2.1	Vorarbeiten .....	30
2.2.1.1	Differential Display RT-PCR .....	30
2.2.2	Zellkultur .....	31
2.2.3	Induktion und Nachweis von Apoptose .....	32
2.2.4	Magnetische Separation und Depletion .....	32
2.2.5	Gesamt-RNA-Präparation mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	33
2.2.6	Messung der RNA-Konzentration .....	34
2.2.7	Northern Blot.....	34
2.2.8	Herstellung radioaktiv-markierter DNA- und RNA-Proben .....	35
2.2.9	Bestimmung der Radioaktivität markierter DNA- und RNA-Sonden.....	36
2.2.10	Northern-Blot-Hybridisierung.....	36
2.2.11	Herstellung von polyA <sup>+</sup> - mRNA .....	37
2.2.12	Herstellung einzelsträngiger cDNA .....	37
2.2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.14	Klonierung von PCR-Produkten .....	38
2.2.14.1	Ligation .....	38
2.2.14.2	Transformation von Escherichia coli durch Hitze-Schock; $\alpha$ -Komplementierung.....	39
2.2.14.3	Minipräparation und Maxipräparation von Plasmid-DNA .....	40
2.2.15	Messung der DNA-Konzentration .....	40
2.2.16	Restriktionsverdau .....	40
2.2.17	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	41
2.2.18	DNA - Sequenzierung .....	41
2.2.19	Präparation von Gesamtprotein .....	41
2.2.20	Protein-Konzentrationsbestimmung .....	42
2.2.21	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ....	42
2.2.22	Western Blot .....	42
2.2.23	Membranpräparation aus BL60-2-Zellen .....	43
2.2.24	Expression klonierter cDNA in BL60-2 - Zellen .....	43
2.2.25	Ficoll-Aufreinigung .....	44
2.2.26	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	44
2.2.27	Anreicherung transfizierter Zellen .....	45
2.2.28	Durchflusszytometrie / Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) .....	46
2.2.29	Immunfluoreszenz.....	46
2.2.30	Radioaktive Markierung von Proteinen .....	47
2.2.31	Immunpräzipitation.....	47



2.2.32	Autoradiographischer Nachweis <sup>35</sup> S-haltiger Proteine .....	48
2.2.33	Elektronenmikroskopie .....	48
2.2.34	Massenspektrometrie .....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
3.1	IDENTIFIZIERUNG APOPTOSE-ASSOZIIERTER GENE UND CHARAKTERISIERUNG DES GENPRODUKTS LAPTM5 .....	49
3.1.1	Differential Display RT-PCR .....	49
3.1.2	Klonierung und Sequenzanalyse von RT-PCR-Produkten.....	50
3.1.3	Northern Blot Hybridisierungen.....	54
3.1.4	Western Blot von LAPTM5 .....	56
3.1.5	Expressionsmuster von LAPTM5.....	56
3.1.6	Immunfluoreszenzmikroskopie LAPTM5 .....	57
3.1.7	FACS-Analyse von LAPTM5.....	58
3.1.8	Membranständige Lokalisation von LAPTM5.....	60
3.1.9	Protein-labeling und Immunpräzipitation von LAPTM5 .....	60
3.1.10	Elektronenmikroskopische Lokalisation von LAPTM5 .....	61
3.2	EPISOMALE GENEXPRESSION IN BL60-2-ZELLEN .....	65
3.2.1	EGFP-Expression als Reportersystem und Elektroporation von B-Zellen ...	65
3.2.2	Aufreinigung transfizierter Zellen .....	68
3.2.2.1	Selektion über Resistenzmarker: .....	69
3.2.2.2	Magnetische Separation über das Oberflächenantigen $\Delta$ CD4 .....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1	IDENTIFIZIERUNG APOPTOSE-ASSOZIIERTER GENE IN BL60-ZELLEN .....	76
4.2	LAPTM5: STRUKTUR UND EXPRESSIONSMUSTER .....	78
4.2.1	Struktur des LAPTM5-Gens und potentielle Struktureigenschaften von LAPTM578	
4.2.2	Gewebespezifische Expression von LAPTM5 .....	79
4.2.3	Transkriptionelle Regulation von LAPTM5.....	79
4.3	LAPTM5 – SUBZELLULÄRE LOKALISATION .....	81
4.4	DIFFERENTIAL DISPLAY RT-PCR UND ALTERNATIVE METHODEN .....	85
4.5	EPISOMAL STABILE GENEXPRESSION IN B-ZELLEN .....	88
4.5.1	Elektroporation von B-Zellen und Expression von EGFP .....	88
4.5.2	Selektion transfizierter Zellen.....	89
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>105</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>106</b>

# 1 Einführung

## 1.1 Apoptose – ein universeller biologischer Prozess

Die einzelne Zelle als Grundeinheit komplexer biologischer Systeme unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen. Zellteilung, Zellwachstum, Differenzierung und letztlich Zelltod sind Prozesse, die eine Zelle während ihres Lebens durchläuft. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Ausbildung intakter Zellen und Zellverbände unterliegen die genannten Prozesse einer besonders strengen Regulation. Die physiologische Form des Zelltodes wird als Programmierter Zelltod (PCD) oder Apoptose bezeichnet, die pathologische Form als Nekrose. Obwohl der Prozess eines physiologischen Zelltodes bereits seit dem Ende des 19. Jahrhunderts postuliert wurde ([Rich et al., 1999](#)), fehlte lange Zeit dessen genaue Definition. Erst 1972 erfolgte durch Kerr, Wyllie and Currie aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine morphologische Definition des physiologischen Zelltodes ([Kerr et al., 1972](#)). Gleichzeitig führten sie den Begriff Apoptose ein, der im Griechischen das Abfallen der Blätter vom Baum beschreibt. Apoptose ist essentiell für die Differenzierung und Homöostase von Geweben und findet während des gesamten Lebens eines Organismus in unterschiedlichem Ausmass statt. In der frühen Ontogenese ist Programmierter Zelltod an der Ausbildung von Gewebs- und Organstrukturen beteiligt, später u.a. an der Kontrolle der Zellzahl und der Eliminierung nichtfunktioneller oder maligner Zellen. So wird während der Entwicklung des Thymus dessen ursprüngliche Zellpopulation infolge apoptotischer Prozesse um 95% reduziert ([Jacobson et al., 1997](#)).

Programmierter Zelltod ist ein biologischer Vorgang, der genetisch fixiert ist und charakteristische morphologische und biochemische Merkmale besitzt. Zelltyp und Differenzierungsstadium einer Zelle sind entscheidend für das Signal, das zur Auslösung des Programmierten Zelltodes führt. Apoptose wird ausgelöst über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren (CD95-, TNF- und B-Zell-Rezeptor, s.u.), durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Ebenso wird das apoptotische Programm über intrazelluläre Rezeptoren (Glucocorticode), DNA-Schädigung (UV- und Röntgenstrahlung, Zytostatika) oder Störungen des Zellmetabolismus (Nukleotidsynthese) initiiert. Alle genannten Aktivierungsmechanismen führen

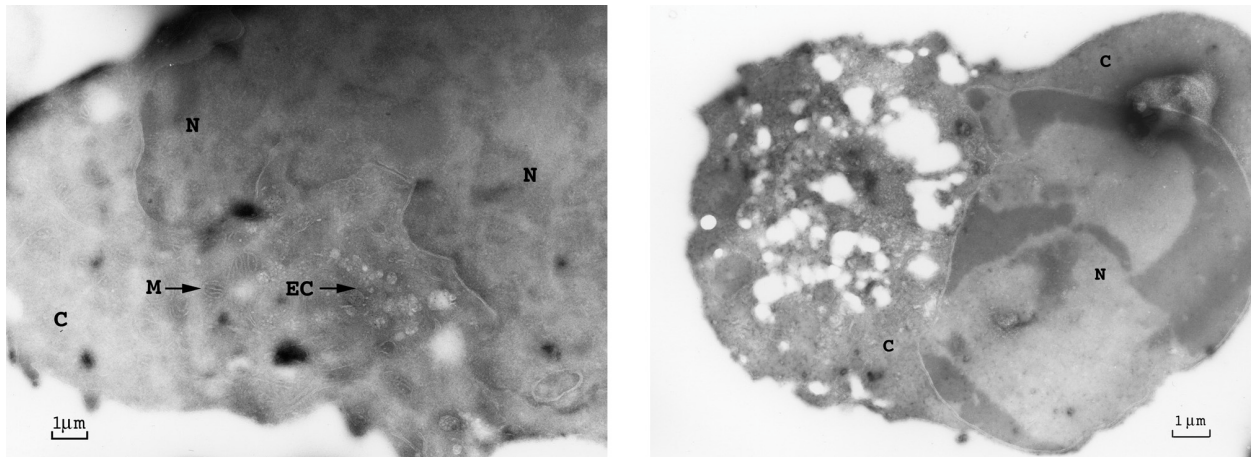
zum Ablauf eines relativ einheitlichen, genetisch determinierten Programmes, welches mit dem Tod der Zelle endet.

## 1.2 Differenzierung von physiologischem und pathologischem Zelltod

Aufgrund ihrer Bedeutung für den Organismus sowie ihrer spezifischen Morphologie und Biochemie lassen sich zwei Arten von Zelltod unterscheiden: physiologischer Zelltod (Apoptose oder Programmierter Zelltod) und pathologischer Zelltod (Nekrose). Nekrotischer Zelltod erfolgt nach starker Zellschädigung durch mechanische oder chemische Noxen. Im Verlauf der Nekrose bricht der osmotische Gradient über der Zellmembran zusammen, es kommt zum Ioneneinstrom, nachfolgendem Einstrom von Wasser und somit zur Volumenzunahme der Zelle und der Zellorganellen. Charakteristisch ist ein ungeordneter Abbau von makromolekularen Strukturen, die Zelle wird irreversibel geschädigt und lysiert innerhalb kurzer Zeit. Zytoplasmatische Bestandteile und Membranfragmente führen zur Schädigung umliegender Zellen, die Folge ist bei stärkerem Gewebszerfall eine Zytokin-vermittelte Entzündungsreaktion.

Erste direkte Beweise für eine andere Art von Zelltod ergaben sich aufgrund histochemischer Studien, die in den sechziger Jahren von Kerr durchgeführt wurden ([Kerr et al.,1965](#)). Die untersuchten, postischämischen Hepatozyten zeigten Organellen, die sich eindeutig von denen nekrotischer Zellen unterschieden. Eine genaue Beschreibung dieser spezifischen Merkmale erfolgte einige Jahre später mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Apoptotische Zellen zeigen eine typische Kondensation des Kernchromatins, die Kerne werden pyknotisch und fragmentieren. Die Zytoplasmamembran zieht sich zusammen, es entstehen Ausweitungen und Knospungen der Membran (membrane blebbing) und schliesslich apoptotische Körper, die Kernfragmente, Organellen und andere zytoplasmatische Bestandteile umschliessen. Bedeutsam ist, dass es nicht zur unkontrollierten Abgabe von Zellbestandteilen in die Umgebung der Zelle kommt und die Integrität der Organellen erhalten bleibt. Die apoptotischen Körper werden von Makrophagen, Histiozyten oder fakultativen Phagozyten aufgenommen ([Kerr et al.,1972](#)). Dadurch wird die Schädigung umliegenden Gewebes und eine mögliche Entzündungsreaktion verhindert. Die Erkennung apoptotischer Zellen erfolgt über membranassoziierte Moleküle apoptotischer Zellen und deren Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten ([Hart et al.,1996](#); [Savill and Fadok,2000](#)). Phagozytose wird

vermittelt über Phosphatidylserin (PS)-, Lectin-, Scavenger- und 61D3-Rezeptoren. Der jeweils aktive Mechanismus ist abhängig von den beteiligten Zelltypen, den Interaktionsbedingungen sowie von Korezeptoren ([Fadok et al., 1992](#)). Der physiologische Zelltod epithelialer Zellen, ausgelöst durch den Verlust von Zell-Matrix-Kontakten, wird als Anoikis (griechisch: heimatlos) bezeichnet. In Abbildung 1 sind BL60-2-Zellen vor Induktion von Apoptose und 16 Stunden nach Induktion zu sehen.



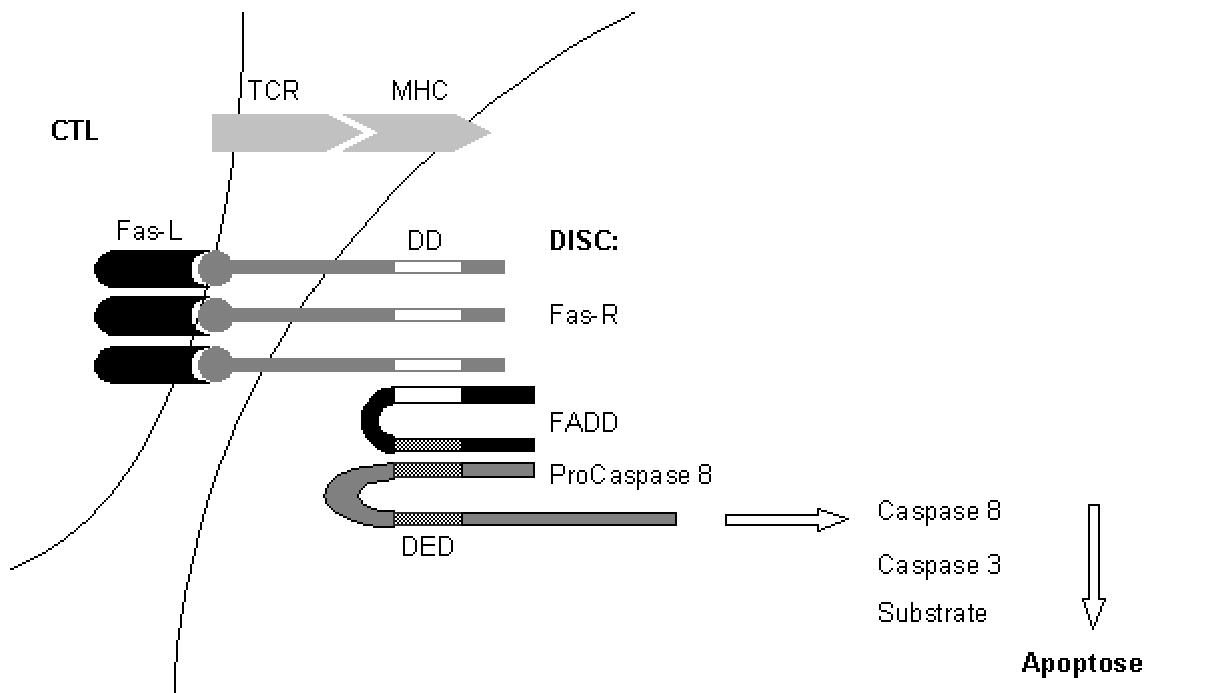
**Abbildung 1** Elektronenmikroskopische Aufnahmen. Links: Humaner B-Lymphozyt (BL60) vor Apoptose-Induktion. Rechts: BL60-Zelle 16 Stunden nach Induktion von Apoptose durch Inkubation mit anti-IgM. Deutlich zu sehen sind die Kondensation des Kernchromatins, die beginnende Fragmentierung sowie Schrumpfung der Zellmembran. N – Nukleus, C – Cytosol, M – Mitochondrien, EC – Endosomales Kompartiment.

### 1.3 Apoptose: Signaltransduktion und Regulation

#### 1.3.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose und Fas-/CD95-System

Apoptose kann durch eine Vielzahl von Signalen ausgelöst werden. Ein bedeutender Mechanismus zur Induktion des Programmierten Zelltodes ist die Interaktion spezifischer Liganden mit Rezeptoren der Zielzelle. Intensiv untersucht wurden vor allem die Cytokine TNF- $\alpha$  und Fas-Ligand (Fas-L, Synonyme: CD95, APO1) und ihre Rezeptoren (TNFR1, Fas-Rezeptor). FasL wird zur TNF-Familie von Cytokinen gerechnet und in membranständiger Form sowie als lösliches Cytokin synthetisiert ([Krammer et al., 2000](#)). Der membranständige FasL ist jedoch wesentlich potenter, so dass FasL-vermittelte Apoptose wahrscheinlich vorwiegend über Zell-Zell-Interaktion ausgelöst wird. Der entsprechende Fas-Rezeptor gehört zur TNF-Rezeptor-Familie und besitzt eine charakteristische, intrazelluläre Domäne (Death domain). Die Aktivierung durch FasL induziert

die Trimerisierung des Rezeptors und die nachfolgende Bindung weiterer Proteine über die Death domain. Der neuformierte Proteinkomplex, als DISC (Death inducing signalling complex) bezeichnet, führt letztlich zur Aktivierung von Proteasen (Caspase8 und Caspase3, s.u.) und damit zur Auslösung des apoptotischen Programmes in der Zelle.



**Abbildung 2** Fas-Signaltransduktion. Cytotoxische T-Zellen exprimieren nach TCR-Aktivierung verstärkt membrangebundenes Fas (Fas-L bzw. CD95-L). Fas-L interagiert mit dem Fas-Rezeptor (Fas-R) der Zielzelle. Nach Oligomerisierung von Fas-R wird ein Proteinkomplex (DISC, Death Inducing Signalling Complex) gebildet: Via DD-Bindungsstelle (Death Domain) wird das Adaptermolekül FADD (Fas-associated Death Domain Protein) gebunden. FADD wiederum kann ProCaspase 8 binden, die Interaktion erfolgt über die DED-Bindungsstelle (Death Effector Domain). Nach Aktivierung kann Caspase 8 direkt Caspase 3 spalten, die Amplifikation des Signals erfolgt hier ohne Mitwirkung der Mitochondrien. In der Abbildung nicht gezeigt ist ein alternativer Weg der Fas-Signaltransduktion, der nach Aktivierung von Bid unter Einbeziehung der Mitochondrien abläuft und schliesslich ebenfalls zur Spaltung von Caspase 3 führt.

Die physiologische Rolle des Fas-Systems ist wahrscheinlich auf immunologische Prozesse beschränkt. Der Fas-Rezeptor wird ubiquitär exprimiert, die Expression des Fas-Liganden ist jedoch auf reife, aktivierte T-Zellen (CD4+/CD8+), cytotoxische T-Zellen (CTL), natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie immunprivilegiertes Gewebe (Auge, Testis) beschränkt. Immunprivilegiertes Gewebe ist in der Lage, einwandernde, immunkompetente Zellen durch Induktion von Apoptose zu entfernen und somit jegliche zellvermittelte Immunreaktion, die potentiell gewebsschädigend ist, zu unterdrücken. Die Deregulation von Fas-assoziierten Effektormechanismen spielt eine Rolle bei der Pathogenese der fulminanten Hepatitis (abnormal aktivierte CTL's) und des Auto-

immunbedingten Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS), dem ein Funktionsverlust des Fas-Rezeptors zugrunde liegt ([Nagata et al.,1997](#); [Matiba et al.,1997](#)).

### 1.3.2 *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*

Untersuchungen unterschiedlicher Organismen haben gezeigt, dass Apoptose-ähnliche Prozesse weit verbreitet sind und sich die Entwicklung des in Vertebraten vorhandenen, komplexen apoptotischen Programms schrittweise vollzogen hat. Der programmierte Zelltod stellt somit ein evolutionär konserviertes, biologisches Prinzip dar. Sehr intensiv untersucht wurden vor allem *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*. *C.elegans* entwickelt im Verlauf seiner Ontogenese eine konstante Anzahl somatischer Zellen (1090), genau 131 dieser Zellen sterben durch Programmierten Zelltod. Durch Mutationsanalysen wurde eine Reihe von Genen charakterisiert, die den Programmierten Zelltod in *C.elegans* beeinflussen und deshalb als ced-Gene (*C. elegans* death genes) bezeichnet werden ([Ellis and Horvitz,1986](#)). Weitere Untersuchungen ergaben, dass den Genprodukten CED3, CED4 und CED9 besondere Bedeutung bei der Regulation der Apoptose zukommt, wobei CED3 und CED4 proapoptotisch wirken, CED9 dagegen hemmend ([Hengartner et al.,1992](#)). Die Klonierung von ced3 und nachfolgende Sequenzanalysen zeigten, dass das Genprodukt von ced3 starke Homologien zur Familie der humanen ICE-Proteasen aufweist ([Yuan et al.,1993](#)). Es wurden weitere humane Proteasen identifiziert, die ced3 bzw. ICE-Proteinen strukturell und funktionell ähnlich sind und als eine neue Klasse unter dem Begriff Caspasen (Cysteinyll aspartate-specific proteinases, s.u.) zusammengefasst werden ([Alnemri et al.,1996](#); [Nicholson and Thornberry,1997](#)).

Das humane Homologe zu CED9 ist das BCL2 (B cell lymphoma)-Protein ([Hengartner and Horvitz,1994](#)). Die Expression von humanem BCL2 verhindert in *C.elegans* vollständig und in ced9-negativen Mutanten teilweise Apoptose, was die Konservierung von Teilen des apoptotischen Programmes belegt. 1997 entdeckte die Gruppe von Zou, dass APAF1 (apoptosis protease-activating factor) das humane Äquivalent des CED4-Gen-Produkts ist ([Zou et al.,1997](#)). APAF1 wurde zusammen mit APAF2 und APAF3 aus humanen Zellextrakten isoliert. APAF2 wurde als Cytochrom c und APAF 3 als Caspase9 identifiziert ([Liu et al.,1996](#)).

In *Drosophila melanogaster* wurden die proapoptotischen Gene hid (head involution defektive), reaper und grim identifiziert. Reaper besitzt Sequenzhomologien zum

intrazellulären Anteil des humanen CD95/FAS-Rezeptors und ist gemeinsam mit hid vor allem in der Embryonalphase von *D. melanogaster* aktiv. Bei Funktionsausfall der entsprechenden Proteine kommt es in einem frühen Stadium zum Absterben der *Drosophila*-Larven aufgrund deregulierten Wachstums ([White et al., 1994](#)).

### 1.3.3 Caspasen

Caspasen sind Proteasen, die spezifisch im Rahmen des Programmierten Zelltodes aktiviert werden und Hauptmediatoren apoptotischer Signale darstellen. Ihre Bedeutungen ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

- Die Aktivierung von Caspasen korreliert mit der Ausbildung des apoptotischen Phänotyps.
- Caspasen sind verantwortlich für die Proteolyse von Proteinen, die selektiv mit Beginn der Apoptose gespalten werden und in die Ausbildung des Phänotyps der apoptotischen Zelle involviert sind.
- Die Herabsetzung der enzymatischen Aktivität von Caspasen durch spezifische Inhibitoren kann Apoptose verhindern.

Die Bedeutung proteolytischer Prozesse für die Apoptose wurde durch Untersuchungen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität erkannt. Hauptbestandteile der durch T-Zellen freigesetzten Granula sind Proteasen, die als Granzyme bezeichnet werden. Diese Granzyme sind in der Zielzelle für die Aktivierung des apoptotischen Programmes verantwortlich ([Froelich et al., 1998](#)). Die ähnliche Substratspezifität von Granzymen und der zytoplasmatischen ICE-Protease, die Identifizierung von ICE als CED3-Homologes sowie die Entdeckung der Caspasen verstärkten die Annahme, dass Proteasen wesentliche Bestandteile eines konservierten biologischen Mechanismus darstellen ([Thornberry et al., 1992](#); [Wilson et al., 1994](#)). Caspasen spalten Substrate nach einem Aspartat-Rest, der sich an Position 1 einer aus 4 definierten Aminosäuren bestehenden Spaltsequenz befindet. Das Vorhandensein des Aspartat-Restes ist essentiell für die Proteolyse des Substrats: wird Aspartat durch eine beliebige andere Aminosäure ersetzt, kann das Substrat nicht gespalten werden. Diese Selektivität ist ein wesentliches Merkmal aller Proteasen der Caspasen-Familie und entscheidend für ihre Rolle innerhalb des PCD. Aufgrund ihrer Sequenz wurden die Caspasen in zunächst 2 unterschiedliche Subgruppen unterteilt, eine ICE/Caspase1-Gruppe und eine Caspase3-



Gruppe. Funktionelle Analysen zeigten, dass Mitglieder der ICE-Gruppe vorwiegend in Entzündungsprozessen aktiv sind, während die Caspase3-ähnlichen Proteasen hauptsächlich in den apoptotischen Prozess involviert sind. Verfeinert wurde die Einteilung der Caspasen in funktionelle Gruppen durch Screenings mit verschiedenen Peptidsubstraten. Es wurden 3 Gruppen mit jeweils konservierter Substratspezifität differenziert, die in Tabelle 1 dargestellt sind (nach: [Nicholson and Thornberry, 1997](#); [Wolf and Green, 1999](#)):

**Tabelle 1:** Einteilung der Caspasen

<b>Caspasen-Gruppe, Funktion</b>	<b>Spaltsequenz</b>	<b>Name</b>	<b>Synonyme</b>
Gruppe 1 Proteolytische Aktivierung proinflammatorischer Zytokine	WEHD	Caspase1	ICE
		Caspase4	ICE-II
		Caspase5	ICE-III
		Caspase11, 12, 13, 14	
Gruppe 2 Apoptose-ausführende Caspasen (executioners)	DExD	Caspase3	CPP32
		Caspase7	Mch3
		Caspase6	Mch2
Gruppe 3 Apoptose-auslösende Caspasen (initiators)	(IVL)ExD	Caspase2	ICH1
		Caspase8	Mch5, FLICE
		Caspase9	Mch6
		Caspase10	
		Granzym B	

### 1.3.3.1 Struktur und biologische Aktivität der Caspasen

Caspasen bestehen aus einer N-terminalen Pro-Domäne, einer grossen Untereinheit (ca. 20kDa) sowie einer C-terminalen kleinen Untereinheit (10kDa). Nach proteolytischer Aktivierung bilden jeweils zwei grosse und kleine Untereinheiten ein Tetramer. Die Aktivität der Caspasen wird durch verschiedene reversible und irreversible Inhibitoren herabgesetzt. Die Produktion von reversiblen Caspase-Inhibitoren durch Viren verhindert den apoptotischen Zelltod der infizierten Wirtszelle. CrmA (Cytokine response modifier A) wird von Kuhpockenviren produziert und inhibiert Apoptose, indem es an die aktiven Domänen der Caspasen 1 und 3 bindet ([Gagliardini et al., 1994](#)). Das vom Baculovirus gebildete Protein p35 hemmt irreversibel verschiedene Caspasen ([Xue and Horwitz, 1995](#)), besonders effizient jedoch Caspase3. Ebenfalls viral codiert sind die IAP (Inhibitors of apoptosis)-Proteine, die vor allem Caspasen der Gruppe 2 hemmen und für die im Gegensatz zu zu den Inhibitoren CrmA und p35 humane Homologe identifiziert wurden. Neben den natürlichen Caspasen-Inhibitoren sind synthetische bzw. nicht-physiologische Inhibitoren beschrieben, durch die experimentell eine Gruppen-spezifische Hemmung der Caspasen möglich ist.

### 1.3.3.2 Caspase-negative Mausmodelle

Die biologische Bedeutung einzelner Caspasen wurde vor allem durch Experimente mit knock-out-Mäusen dargelegt: ICE/Caspase1-negative Mäuse zeigen Defekte in der Prozessierung von proIL1-beta und anderen Zytokinen ([Kuida et al., 1995](#)). Thymocyten dieser Tiere reagieren ex vivo adäquat auf diverse Apoptose-Stimuli (Ausnahme: Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose). Da sich Caspase1-negative Mäuse normal entwickeln und kein weiterer pathologischer Phänotyp zu beobachten ist, scheint dieser Protease keine zentrale Bedeutung innerhalb des Programmierten Zelltodes zuzukommen. CPP32/Caspase3 wurde 1994 als ICE- bzw. CED3-Homologes beschrieben ([Fernandes-Alnemri et al., 1994](#)). Caspase3-negative Mäuse zeigen im Gegensatz zu ICE-defizienten Mäusen ausgeprägte Defekte in ihrer Embryonalentwicklung, werden unreif geboren und versterben früher als die Kontrolltiere. In Hirnarealen, die während der Ontogenese durch das Auftreten pyknotischer Cluster als Folge massiver Apoptose neuronaler Zellen gekennzeichnet sind, fehlen diese Cluster vollständig. Gleichzeitig vorhandene erhöhte Hirnmassen sowie ektopische Zellformationen und atypische Strukturduplikationen sind bezeichnend für einen defekten neuronalen Apoptose-Mechanismus.

Auch in Caspase3-negativen Mäusen fehlen Anzeichen für Defekte der Thymocyten-Apoptose oder eine gestörte Entwicklung und Funktion anderer Organe. Aufgrund des ausgeprägten neuropathologischen Phänotyps scheint Caspase3 eine nichtredundante Rolle innerhalb des programmierten Zelltodes von Neuronen zu spielen, jedoch für die Apoptose anderer Zelltypen nicht essentiell zu sein ([Kuida et al., 1996](#)). Caspase9- und APAF1-negative Mäusen verstarben perinatal und zeigten ebenfalls eine verminderte Apoptose-Rate innerhalb des ZNS. Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Experimenten, dass Caspasen in Abhängigkeit von Zelltyp und Differenzierungsstadium exprimiert bzw. für die Ausführung des apoptotischen Programmes rekrutiert werden.

### 1.3.3.3 Aktivierung von Caspasen

Caspasen existieren als Proenzyme, die durch Autoaktivierung(1), Transaktivierung(2), spezifische Proteolyse(3) sowie durch Assoziation mit Cofaktoren(4) aktiviert werden ([Hengartner, 2000](#)):

- Inaktive Caspasen besitzen eine basale proteolytische Aktivität. Autoaktivierung kann erfolgen bei erhöhter lokaler Konzentration der Caspasen im Bereich von Rezeptoren der Zellmembran oder mitochondrialen Proteinen (induced proximity model). Diese Adaptermoleküle verfügen über spezifische Bindungsdomänen (death domain – DD, death effector domain – DED oder caspase recruitment domain - CARD), die auch in Caspasen mit langer Pro-Domäne vorkommen und über die eine Bindung und Konzentration der Caspasen erfolgt.
- Nach initialer Aktivierung einer Caspase kann durch Bindung und Proteolyse die Aktivierung weiterer Procaspasen erfolgen (Transaktivierung), wodurch die Amplifikation des apoptotischen Signals erfolgt.
- Die bereits geschilderte, T-Zell-getriggerte Aktivierung des PCD in einer Zielzelle durch Granzyme B ist ein Beispiel für proteolytische Aktivierung durch Nicht-Caspasen.
- Caspase9 wird erst nach Assoziation mit APAF1, einem aus den Mitochondrien freigesetzten Cofaktor, vollständig enzymatisch aktiv. Voraussetzung für die Bildung dieses Holoenzym, das auch als Apoptosom bezeichnet wird, ist die Aktivierung von APAF1 durch Cytochrom c.

### 1.3.3.4 Substrate der Caspasen

Substrate der Caspasen tragen in ihrer Gesamtheit zur Ausbildung des Phänotyps apoptotischer Zellen bei. Diese Substrate sind z.B. beteiligt an der Aufrechterhaltung der zellulären Stabilität und an intrazellulären Transportprozessen, sind in die Signaltransduktion involviert und besitzen Funktionen im Rahmen des DNA- und RNA-Metabolismus. Hier eine kurze Übersicht über bisher identifizierten Caspasen-Substrate (nach: [Nicholson and Thornberry, 1997](#); [Tan and Wang, 1998](#); [Wolf and Green, 1999](#)):

**Tabelle 2:** Substrate der Caspasen

Substrat	Konsequenz der Spaltung
<i>Pro- und anti-apoptotische Proteine:</i>	
Procaspasen, BCL2, BCLX <sub>L</sub> , BID	Signal-Amplifikation, Inaktivierung von Inhibitoren
<i>Proteine, verantwortlich für den apoptotischen Phänotyp:</i>	
ICAD, gelsolin, PAK2, MEKK1, PKC-delta	Induktion des apoptotischen Phänotyps
<i>Strukturproteine und assoziierte Moleküle:</i>	
Actin, Gas2, Fodrin, Keratine, Lamine, NuMa, SAF-A, Rabaptin, Catenin, FAK	Zytoskelett-Fragmentierung, Verpackung von Zellbestandteilen
<i>Proteine, verantwortlich für die zelluläre Homöostase:</i>	
DNA-PK, PARP, U1-70kDa, RFC-140, HnRNPs, D4-GDI, Transkriptionsfaktoren	Unterbindung zellulärer Reparaturmechanismen und der Biosynthese von Makromolekülen
<i>Andere:</i>	
Huntingtin, Presenilin, Atrophin-1, Ataxin-3	unbekannt

Stark vereinfacht resultieren aus den Spaltungen folgende biologische Effekte:

- Auflösung und Umordnung des Zytoskeletts und des Zellkerns
- Inaktivierung von Reparaturmechanismen
- Verhinderung weiterer Zellteilungen
- Isolierung der apoptotischen Zelle innerhalb des Zellverbandes und
- Kennzeichnung der Zelle zur Phagozytose.

Die aufgeführten Signalproteine lassen vermuten, dass Signaltransduktionswege, die in Bezug auf die Vermittlung apoptotischer Signale noch nicht näher charakterisiert wurden, neben den Caspasen von Bedeutung sind.

#### 1.3.4 Die BCL2-Familie

Genrearrangements sind neben Mutationen die häufigste Ursache für die Entwicklung von Tumoren. Folge dieser Rearrangements können Gendeletionen, Fusionsgene oder deregulierte Gene sein. Lymphatische Tumoren sind vorwiegend mit Translokationen im Bereich der Immunglobulingene und der T-Zell-Rezeptorgene verbunden. Prädisponiert sind diese Gene durch die physiologische Umordnung, der sie während der B- und T-Zell-Differenzierung unterliegen. In follikulären B-Zell-Lymphomen sind in 80% der Fälle Translokationen zwischen den Chromosomen 14 und 18 (t(14;18)(q32;q21)) zu finden. Das in der Nähe der Bruchstelle auf Chromosom 18 liegende Gen *bcl2* gerät durch die Translokation unter die transkriptionelle Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten-Promotors und ist in der Folge dauerhaft aktiviert ([Bakshi et al., 1985](#); [Cleary and Sclar, 1986](#)).

Bcl2-negative Mäuse zeigen ausgeprägte Immundefekte ([Veis et al., 1993](#)). Lymphozyten und neuronale Zellen *bcl2*-transgener Mäuse besitzen *in vitro* nach Wachstumsfaktorentzug eine erhöhte Lebensdauer. Das BCL2-Protein scheint somit essentiell zu sein für das Überleben von Zellen mit physiologisch langer Lebenszeit. Es wirkt jedoch nicht in allen Geweben protektiv, d.h. es existieren differenzierungsabhängige Expressionmuster sowie Mechanismen, die trotz BCL2-Aktivität zum Zelltod führen.

Mehrere Proteine wurden entdeckt, die BCL2 strukturell ähneln und als BCL2-Protein-Familie zusammengefasst sind. Es werden proapoptotische (BAX, BCL-X short, BAD, BAK, BIK, BID u.a.) und antiapoptotische Proteine (BCL2, BCL-X long, BCL-w, u.a.)

unterschieden, deren Ratio teilweise die Empfindlichkeit einer Zelle für Apoptosesignale definiert ([Gross et al.,1999](#)). Proteine der BCL2-Familie können Homo- und Heterodimere bilden und sind in der Lage, integrale Membranproteine zu bilden.

Wesentliches Merkmal dieser Protein-Familie ist das Vorhandensein von bis zu vier konservierten Domänen, BH1-BH4, die eine Interaktion der Proteine ermöglichen und für unterschiedliche Wirkungen verantwortlich sind. Die Domänen BH1-BH4 sind in den antiapoptotischen BCL2-Homologen vorhanden. Proapoptotisch wirkende Proteine sind dagegen gekennzeichnet durch eine fehlende BH4-Domäne. Die Bildung von Dimeren erfolgt durch Interaktion der BH3-Domäne eines Moleküls mit hydrophoben Resten eines weiteren Proteins der BCL2-Familie.

### **1.3.5 Interaktion von Caspasen, Proteinen der BCL2-Familie und Mitochondrien**

Apoptose-induzierende Signale können über unterschiedliche Mechanismen zum Zelltod führen, die bedeutendsten sind:

- die direkte Aktivierung von Caspasen über Rezeptoren (Fas-System, s.o.) und
- die indirekte Aktivierung von Caspasen durch freigesetzte mitochondriale Moleküle.

#### *1.3.5.1 Mitochondrien als Mediatoren apoptotischer Signale*

Die mitochondriale Integrität und die Freisetzung Apoptose-assoziiierter Moleküle wird wesentlich durch BCL2-Proteine kontrolliert. In intakten Zellen liegen die antiapoptotischen BCL2-Proteine als integrale Membranproteine von Mitochondrien, Nucleus und ER vor. Pro-apoptotische Proteine wie BID und BIM dagegen sind vorwiegend cytosolisch lokalisiert. Letztere werden nach einem Apoptose-Signal modifiziert (Dephosphorylierung, Proteolyse), so dass eine Translokation zur mitochondrialen Membran möglich ist. Dort erfolgt eine direkte Interaktion mit antiapoptotischen BCL2-Proteinen bzw. die Integration in die mitochondriale Membran. Wie beeinflussen BCL-2 Proteine mitochondriale Funktionen, wie erfolgt die Freisetzung mitochondrialer Proteine im Rahmen des Programmierten Zelltodes? Folgende Modelle werden diskutiert ([Gross et al.,1999](#); [Hengartner,2000](#)):

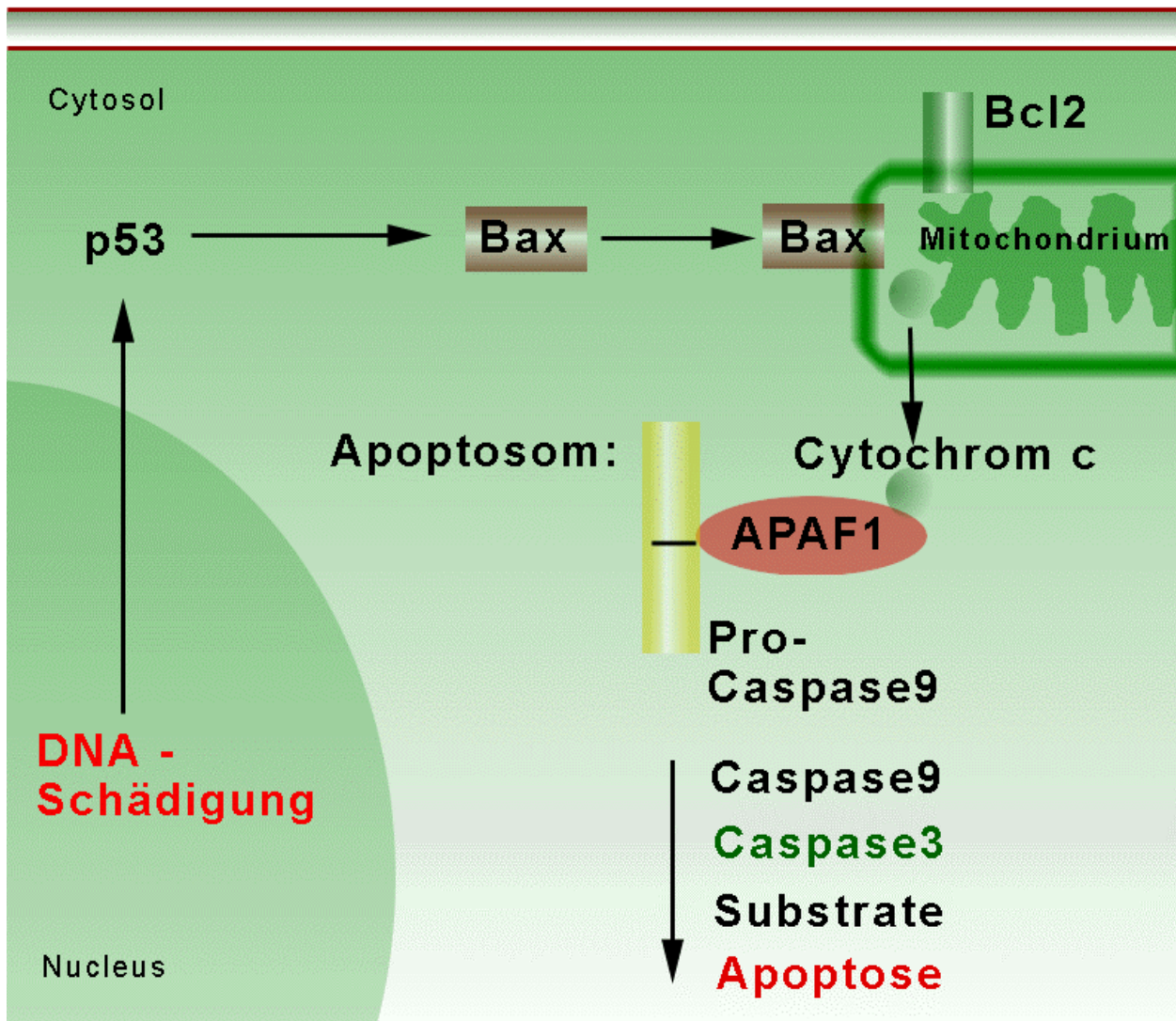
- BCL2-Proteine bilden Kanäle in der äusseren Membran der Mitochondrien aus, die eine geringe Leitfähigkeit für Ionen besitzen. Ob diese Kanäle auch für Cytochrom c und andere mitochondriale Proteine durchlässig sind, ist umstritten.

- Proteine der BCL2-Familie interagieren mit Proteinen der mitochondrialen Membran, insbesondere VDAC (voltage dependend anion channel), und induzieren die Bildung von Membrankanälen. VDAC selbst ist nicht durchlässig für Proteine, möglicherweise führt eine Konformationsänderung zur Ausbildung grösserer Kanäle.
- Mitochondriale Kanäle, vor allem PT-Kanäle, werden durch BCL2-Proteine reguliert. PT-Kanäle bestehen aus unterschiedlichen Proteinen, die sowohl in der inneren wie auch in der äusseren Membran lokalisiert sind (Hexokinase, Creatin-Kinase, VDAC, Adenin-Nukleotid-Translokase). Vor allem für pro-apoptotische Proteine wird eine Interaktion mit diesem Proteinkomplex postuliert, die zur Öffnung der PT-Kanäle mit Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, Depolarisation und Mitochondrien-Schwellung führen soll. Anti-apoptotische Proteine der BCL2-Familie dagegen sollen vorrangig eigenständige Ionenkanäle bilden.
- Eine weitere Möglichkeit ist die initiale Änderung der Ionenleitfähigkeit, die zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Anschliessend erfolgt die Schwellung und Ruptur der Mitochondrien und die mitochondrialen Proteine können ins Cytosol diffundieren.

Der genaue Mechanismus, der letztlich zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen Molekülen ins Cytosol führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das freigesetzte Cytochrom c wirkt neben ATP als Cofaktor für Apaf1, das in der Lage ist, über die Oligomerisierung von Caspase9 dessen Autoaktivierung zu induzieren. Caspase9 schliesslich führt zur proteolytischen Aktivierung von Caspase3. Da Caspase3 auch in die Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose involviert ist, wird eine Konvergenz beider Signalwege angenommen. Auf dieser Stufe des apoptotischen Programms greift das ebenfalls aus den Mitochondrien stammende Protein SMAC/DIABLO ein. Durch die Hemmung der IAP-Proteine, die die Aktivität von Caspase3 herabsetzen, wirkt SMAC/DIABLO wie Cytochrom c proapoptotisch ([Du et al.,2000](#); [Verhagen et al.,2000](#)). Mit der Aktivierung von Caspase3 erfolgt der Übergang zur gemeinsamen Endstrecke des apoptotischen



Programmes, d.h. vorwiegend zur Spaltung von weiteren Caspasen sowie von in Tabelle 2 aufgeführten Substraten. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick:



**Abbildung 3** Signaltransduktion Apoptose. Ein apoptotisches Signal, hier als Beispiel die Schädigung von DNA, führt zur Verlagerung des proapoptotischen Proteins Bax vom Cytosol zur äußeren mitochondrialen Membran. Proteine der Bcl-2-Familie regulieren die Freisetzung mitochondrialer Faktoren: Bei einem Übergewicht der proapoptotischen Proteine (hier Bax) gegenüber den antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) treten Cytochrom c und andere Moleküle ins Cytosol über. Cytochrom c bildet mit APAF1 einen Komplex, der Procaspase 9 bindet (Apoptosom). Aktivierte Caspase 9 spaltet Procaspase 3 und es folgt die Endstrecke des apoptotischen Programms mit Spaltung spezifischer Substrate.



### 1.3.5.2 Caspase-aktivierte DNase und Abbau von DNA

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Degradation von DNA, die in drei Schritten erfolgt: Zu Beginn treten Einzelstrangbrüche auf, nächster Schritt ist die grobe DNA-Fragmentierung, bei der DNA-Stränge von 50-200 kbp entstehen. Schliesslich erfolgt die Zerlegung in DNA-Fragmente von 180-200 bp Länge, die durch internucleosomale Spaltung entstehen und durch ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel nachweisbar sind (DNA-Leiter)([Gromkowski et al.,1986](#); [Brown et al.,1993](#); [Wyllie,1980](#)). Durch Enari wurde die verantwortliche DNase, bezeichnet als Caspase-aktivierte DNase (CAD), und der über den CAD-spezifischen Inhibitor (ICAD) vermittelte Regulationsmechanismus identifiziert ([Enari et al.,1998](#)). Danach befindet sich ICAD im Komplex mit CAD im Cytosol, wird nach Auslösung des apoptischen Programmes durch Proteolyse inaktiviert und entlässt dadurch CAD aus seiner Bindung. CAD wandert aufgrund seiner NLS-Signalsequenz (nuclear localization sequence) in den Zellkern und degradiert dort internucleosomal die DNA. Untersuchungen an enucleierten Zellen und CAD-negativen Mäusen zeigten, dass die DNA-Fragmentation für den programmierten Zelltod nicht notwendig ist. Die DNA-Spaltung macht jedoch den Prozess unumkehrbar und erleichtert zudem die Bildung apoptotischer Körper sowie die folgende Phagozytose.

## 1.4 Apoptose in B-Zellen

Eine herausragende Rolle spielen apoptotische Prozesse bei der Entwicklung und Differenzierung des Immunsystems von Vertebraten. Lymphatische Zellen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor, die sich innerhalb des Thymus zu T-Zellen und in der fetalen Leber sowie im adulten Organismus im Knochenmark zu B-Zellen entwickeln.

### 1.4.1 B-Zell Differenzierung und IgM-vermittelte Apoptose in B-Zellen

Die Differenzierung der B-Zellen verläuft über mehrere Stadien, die durch die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle und Enzyme gekennzeichnet sind und mit dem schrittweisen Rearrangement der Immunglobulingene einhergehen. Die reife, naive B-Zelle ist mit einem funktionellen, membranständigen B-Zell-Rezeptor (BCR)

ausgestattet und wandert in die sekundären lymphatischen Organe aus (Lymphknoten, Milz) aus. Dort wird nach Antigenkontakt durch somatische Mutation eine erhöhte Spezifität der B-Zell-Rezeptoren generiert (Keimzentrumsreaktion) und die B-Zelle differenziert weiter in B-Memory-Zellen oder Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen ([Burrows and Cooper,1997](#); [Rajewsky,1996](#)). In allen Stadien der Entwicklung sind strenge Kontrollmechanismen nötig, um die Entstehung defekter oder autoreaktiver B-Zellen zu verhindern. Positive Selektion erfolgt bei Vorhandensein funktioneller Rezeptoren (preBCR, BCR), negative Selektion wird ausgelöst durch eine überhöhte oder verminderte Affinität von preBCR und BCR zum Antigen. In beiden Fällen ist Programmierter Zelltod der Hauptmechanismus zur Elimination der Zellen und wird durch Entzug lebenswichtiger Signale oder durch Generierung Apoptose-induzierender Signale ausgelöst.

Der B-Zell-Rezeptor ist ein Komplex von membranständigem Immunglobulin (sIgM) und einem transmembranen Heterodimer, bestehend aus Ig-alpha und Ig-beta ([DeFranco,1997](#)). Die Vernetzung des BCR führt zur Aktivierung intracellulärer Tyrosinkinasen der Src-Familie (LYN, BLK, FYN), die die zytoplasmatische ITAM (immunoreceptor based activation motif)-Region von Ig-alpha und Ig-beta phosphorylieren und dadurch die Bindung und Aktivierung weiterer Kinasen (SYK, BTK) ermöglicht. Ausgehend von diesen Kinasen werden mindestens 3 Signaltransduktionswege benutzt (Phosphoinositol-Signalweg, RAS-MAP-Kinase-Weg und PI3-K-Signalweg). Die Integration der ins Zellinnere der B-Zelle weitergeleiteten Signale ist abhängig von der Interaktion mit anderen, ebenfalls membranassoziierten Molekülen (CD19, CD21), vom Differenzierungsstadium der Zelle, der Expression Apoptose-fördernder/-hemmender Gene (p53, bcl2) und von der Interaktion mit anderen Zellen (T-Zellen, Follikuläre Dendritische Zellen). So führt die alleinige Vernetzung des B-Zell-Rezeptors ohne weitere costimulatorische Signale in unreifen B-Zellen (IgM-positiv, IgD-negativ) zur Auslösung von Apoptose, andererseits wird bei Vernetzung und gleichzeitiger Aktivierung von CD40 in reifen B-Zellen (IgM-positiv, IgD-positiv) ein Überlebenssignal produziert ([Liu et al.,1997](#); [Osmond et al., 1998](#)).

Kürzlich konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass auch im Verlauf der sIgM-vermittelten Apoptose unreifer B-Zellen eine Änderung der mitochondrialen Permeabilität erfolgt, die eine Aktivierung von Caspase9 sowie anschliessend von Caspase3 induziert ([Doi et al.,1999](#); [Bouchon et al.,2000](#)). Unklar ist derzeit, wie die

Vermittlung des apoptotischen Signals vom BCR zu den Mitochondrien erfolgt und ob weitere Signaltransduktionswege ohne Einbeziehung der Mitochondrien existieren. Bindungsstellen des BCR für Caspasen oder Cofaktoren im Sinne der oben beschriebenen „death domain“ konnten bisher nicht identifiziert werden. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Proteine der BCL2-Familie auch im Rahmen der slgM-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen ([Bargou et al., 1995](#); [Weinmann et al., 1997](#)). Diskutiert wird neben der Rekrutierung und Aktivierung cytosolischer bzw. mitochondrialer Komponenten eine transkriptionelle Regulation des Prozesses. Der geschilderte Mechanismus der slgM-vermittelten Apoptose nach Vernetzung membranständiger IgM-Moleküle ist Grundlage der in der Arbeit eingesetzten Methode zur Auslösung von PCD in B-Zellen (BL60-2).

## 1.5 Genexpression im Rahmen des Programmierten Zelltodes

Welche Rolle spielt der Nucleus im Rahmen des Programmierten Zelltodes? Ist die Transkription bestimmter Gene erforderlich für den Ablauf apoptotischer Programme, insbesondere im Rahmen der B-Zell-Apoptose? Eine *de novo*-Transkription Apoptose-assoziiierter Gene ist für unterschiedliche Organismen und Zelltypen gezeigt worden, so z.B. während der Morphogenese des Kaulquappenschwanzes oder im Rahmen der Dexamethason-induzierten Apoptose von Lymphozyten ([Tata, 1966](#); [Scott, 1995](#)). In *D. melanogaster* erfolgt nach Induktion der Gene reaper, grim und hid die Aktivierung von Caspasen, auch das proapoptotische EGL1 von *C.elegans* wird auf Transkriptionsebene reguliert. Dagegen benötigt der Fas-vermittelte Zelltod keine Transkription. Für die anti-IgM-induzierte Apoptose unreifer B-Zellen liegen noch keine einheitlichen Daten vor, eine transkriptionelle Regulation ist jedoch wahrscheinlich. ([Bouchon et al., 2000](#)). Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die IgM-induzierte Apoptose von B-Zellen durch Cyclohexamid auf der Ebene der Translation gehemmt wird. Ein weiterer Hinweis ist die Abnahme der Expression des Gens c-myc im Verlauf der B-Zell-Apoptose (A.Rickers, Promotion).

## 1.6 Das lysosomal-assoziierte Protein LPTM5

Im Rahmen der Arbeit wurde LPTM5, ein lysosomales Membranprotein (lysosomal-associated protein, 5 transmembranes), genauer untersucht. Die Sequenz des erst

später als LAPTM5 bezeichneten Gens wurde 1995 im Rahmen von Screening-Untersuchungen in unreifen myeloischen Zellen (humane myeloische Linie, KG-1) erstmals beschrieben ([Nagase et al., 1995](#)). Das LAPTM5-Gen wurde ausführlich in einer Arbeit von Adra et. al. charakterisiert und auf Chromosom 1p34 lokalisiert ([Adra et al., 1996](#)). Gegenstand der Arbeit war die Identifikation von Genen, die eine Rolle in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen spielen. Subtraktive Hybridisierungen von hämatopoetischen Zellen (KG1, K562 und DU528) und nichthämatopoetischen Zellen (BS-1, Knochenmark-Stroma-Linie) ergaben eine verstärkte Expression des LAPTM5-Gens in den Zellen der hämatopoetischen Linien. Einen weiteren Hinweis auf eine spezifische Funktion des Gens im Rahmen der Hämatopoese ergab der Vergleich der LAPTM5-Expression in undifferenziertem Gewebe (Maus-Embryo, 9 Tage p.c.) und differenziertem, hämatopoetischem Gewebe (Maus-Embryo, 9 Tage p.c. und 2,5 Tage Zellkultur nach Induktion zur Differenzierung). In undifferenziertem Gewebe erfolgte noch keine Expression von LAPTM5, erst im differenzierten hämatopoetischen Gewebe wurde LAPTM5 exprimiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Expression von LAPTM5 zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung im Gegensatz zum adulten Organismus nicht ausschliesslich auf hämatopoetisches Gewebe beschränkt zu sein scheint. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von LAPTM5 (dort noch als Transkript E3 bezeichnet) während der Retinolsäure-induzierten Differenzierung von Promyelozyten ansteigt ([Scott et al., 1996](#)).

## 1.7 Vorarbeiten

Die Aufklärung apoptotischer Prozesse in B-Zellen ist eines der Schwerpunktthemen innerhalb der Forschungsgruppe. Als experimentelles System wurde eine B-Zell-Linie etabliert, die auf die Inkubation mit anti-IgM-Antikörpern mit Apoptose reagiert. Die Linie (BL60-2) wurde umfassend charakterisiert und wird aufgrund der reproduzierbaren Apoptoseraten, die nach 24 h zwischen 50% und 70% liegen (Spontanrate: 1-5%), für vielfältige Untersuchungen benutzt.

Die Identifikation von Genen bzw. Proteinen, die in den apoptotischen Prozess involviert sind, wird in der Gruppe mit unterschiedlichen Methoden angegangen. Dabei handelt es im wesentlichen um Ansätze, die auf dem Vergleich zwischen apoptotischen und nichtapoptotischen Zellpopulationen beruhen, wobei vor allem die Unterschiede auf

mRNA-Level sowie Protein-Level untersucht werden. Zum Einsatz kamen bisher u.a.

- die subtraktive Hybridisierung,
- die differentielle Hybridisierung von cDNA-Banken sowie
- die vergleichende, zweidimensionale Gelelektrophorese.

Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung der Differential-Display-RT-PCR, einer Methode, die 1992 von Liang und Pardee eingeführt wurde und sich, z.T. modifiziert, als Verfahren zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen durchgesetzt hat ([Liang and Pardee, 1992](#)). Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe durch A. Laubersheimer etabliert und auf das BL60-2 System angewandt. Da das Verfahren die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellt, wird es im Methodenteil beschrieben und später diskutiert.

## 1.8 Zielstellung

Die Charakterisierung apoptotischer Abläufe in B-Zellen ist mit unterschiedlichen Verfahren möglich. Die in der Arbeitsgruppe zur Identifikation unterschiedlich stark exprimierter Gene angewandte Differential-Display-Methode ergab eine Reihe von Kandidatengenen.

- Ziel der Arbeit war die Bestätigung der differentiellen Expression der Kandidatengene durch Hybridisierungsverfahren (Northern Blot). Da eine grössere Anzahl von Kandidatengenen zur Auswahl stand, sollte zu Beginn eine Eingrenzung der relevanten Gene, u.a. durch Sequenzanalysen, vorgenommen werden.
- Nach Bestätigung einer differentiellen Hybridisierung sollte das Gen, seine Expression sowie das Genprodukt in Abhängigkeit vom jeweiligen wissenschaftlichen Kenntnisstand charakterisiert werden.
- Da eine differentielle Genexpression während des PCD lediglich eine Momentaufnahme der Zelle darstellt und keine Aussage über die tatsächliche funktionelle Bedeutung des Genproduktes erlaubt, sind Experimente nötig, in denen der hypothetische Effekt auf die Zelle nachgewiesen wird. Dies ist zum Beispiel durch Ausschaltung des Genes oder durch Überexpression von Wildtyp bzw. Mutanten möglich. Ein weiteres Ziel der Arbeit war daher die Etablierung eines Systems, das eine Expression von Kandidatengenen in BL60-Zellen erlaubt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden Chemikalien folgender Hersteller verwendet:

Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Fluka	Deisenhofen
Oncor	Gaithersburg, USA
Amersham	Braunschweig

#### 2.1.2 Radioaktivität

Radioaktive Chemikalien wurden von NEN Life Science Products, Boston, USA, bezogen.

	Aktivität	Konzentration
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP	3000 Ci/mmol	10 mCi/ml
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] UTP	800 Ci/mmol	10 mCi/ml
[ $^{35}\text{S}$ ] Methionin	1175 Ci/mmol	7,9 mCi/ml

#### 2.1.3 Kits

Qiagen Plasmid Kits, Qiaex Kit	Qiagen, Hilden
High Prime	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNA Sequencing Kit, AmpliTaq FS	Perkin-Elmer, Foster City, USA
ECL Western Blot System	Amersham, Braunschweig
Superscript Preamplification System	GIBCO-BRL/Lifetechnologies, Eggenstein
Riboprobe System	Promega, Madison, USA
MTN Blots (Human, Immunsystem)	Clontech, Heidelberg
BCA Protein Assay	Pierce
DELTA RNA Fingerprint	Clontech, Heidelberg

### 2.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsmarker

Restriktionsenzyme, T4-Ligase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase	INVITEK, Berlin
DNA-Marker (100bp DNA Ladder plus)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Protein-Marker (HMW Standard)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.5 Antikörper, immunologische Produkte

F(ab') <sub>2</sub> Fragment anti-human IgM	Dianova, Hamburg
Annexin-FITC	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Anti-CD4-PE, (Leu3a)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-CD4-FITC, (Leu3a)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-CD19-FITC	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-LAPTM5, rabbit, polyklonal	Dr. Bing Lim, Boston, USA
Anti-rabbit-IgG-Cy3, (C2306)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-rabbit-IgG-FITC	Caltag, Burlingame, USA
Anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-mouse-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Venimmun IgG-Präparation	Centeon, Marburg
Protein-A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

### 2.1.6 Zelllinien

Humane Burkitt-Lymphom-Linie BL60-2, Dr. P.Daniel, Robert-Rössle-Klinik, Berlin,  
Humane Erythroleukämie-Linie HEL, Dr. S.Ansieau, Max-Delbrück-Centrum, Berlin

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von GIBCO-BRL/ Lifetechnologies, Eggenstein, sowie von Biochrom, Berlin, bezogen.

<u>BL60-2 – Medium:</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
RPMI1640	500 ml	1x
FCS, inaktiviert	55 ml	0,1x
Glutamax, 100x	5,5 ml	1x
Natrium-Pyruvat, 100 mM	5,5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin, 10000 IU/ml	5,5 ml	100 IU/ml
HEPES, 1 M	5,5 ml	10 mM
BCS (20 µM)	0,5 ml	20 nM
α-Thioglycerol (50 mM)	0,5 ml	50 µM

<u>HEL-Medium:</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
Dulbecco's MEM	500 ml	1x
FCS, inaktiviert (30 min, 56°C)	55 ml	0,1x
Glutamax, 100x	5,5 ml	1x
Natrium-Pyruvat, 100 mM	5,5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin, 10000 IU/ml	5,5 ml	100 IU/ml
HEPES, 1M	5,5 ml	10 mM



<u>Minusmedium (ohne Cys, Met):</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
RPMI1640 ohne Arginin, Cystein, Leucin, Methionin, Inositol	500 ml	1x
FCS, inaktiviert	50 ml	0,1x
L-Arginin, 100x	5,5 ml	1x
L-Leucin, 100x	5,5 ml	1x
Glucose, 100x	5,5 ml	1x
Inositol, 100x	5,5 ml	1x
Natrium-Pyruvat, 100 mM	5,5 ml	1 mM
HEPES, 1M	5,5 ml	10 mM
Penicillin-Streptomycin, 10000 IU/ml	5,5 ml	100 IU/ml

### 2.1.8 Bakterienstämme

Echerischia coli JM109, Echerischia coli TOP10

### 2.1.9 Bakterienkulturmedien

Zusätze für die Bakterienkultur wurden von Difco Laboratories, Detroit, USA, bezogen.

LB-Medium: 10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, H<sub>2</sub>O bidest zu 1l

LB-Platten: 10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, 15g Agar, H<sub>2</sub>O bidest zu 1l

Ampicilinhaltige Medien: Endkonzentration Ampicilin 100 mg/l

Tetracyclinhaltige Medien: Endkonzentration Tetracyclin 20mg/l

### 2.1.10 Vektoren

pGEM-T	Promega, Madison, USA
pRc/CMV-EGFP	Veniamin Pevzner, MDC, Berlin
pMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
pREP9	Invitrogen, Leek, Niederlande

### 2.1.11 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden bezogen von BioTeZ, Berlin. Sequenzen sind in 5'=>3'-Richtung aufgeführt.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
SP6	GAA TTA GGT GAC ACT ATA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
pREP, sense	GCT CGA TAC AAT AAA CGC
pREP, antisense	GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC

### 2.1.12 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden Puffer und Lösungen mit deionisiertem Wasser angesetzt.

<u>PBS</u>	NaCl	120 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mM
	KCl	3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26 mM, pH 7,2
<u>PBS-FCS-Medium</u>	FCS	2 % (v/v) in PBS
<u>DEPC-H<sub>2</sub>O</u>	DEPC	0,2 % (v/v)
<u>Natriumacetat-Lösung</u>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	3 M
	DEPC	0,2 % (v/v)
<u>EDTA-Lösung</u>	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	0,1 M
	DEPC	0,2 % (v/v)
<u>Tris-Puffer</u>	Tris-HCl	1 M in DEPC-H <sub>2</sub> O, pH 7,4
<u>TE-Puffer</u>	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	5 mM in DEPC-H <sub>2</sub> O, pH 7,4

<u>Cesiumchlorid-Lösung</u>	CsCl	5,7 M
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	100 mM
	DEPC	0,2 % (v/v), pH 5,5
<u>Guanidinium-Lösung</u>	GTC	4 M
	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	20 mM
	Sarcosyl	0,5 % (w/v), pH 5,5
	DTT	0,1 M
<u>10x MOPS-Puffer</u>	MOPS	0,2 M
	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	0,05 M
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	0,01 M, pH 5,5 - 7,0
<u>RNA-Ladepuffer</u>	Glycerol	50 %
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	1 mM
	Bromphenol-Blau	0,25 % (w/v)
	Xylen-Cyanol	0,25 % (w/v)
<u>RNA-Premix</u>	MOPS	1,3x
	Formaldehyd	3M
	Formamid	64 % (v/v)
<u>20x SSC</u>	NaCl	3 M
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	300 mM
<u>SDS-Lösung</u>	SDS	10 % (w/v), pH 7,0
<u>Hybridisierungspuffer</u>	Formamid	50 % (v/v)
	NaCl	0,6 M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,04 M
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	4 mM
	SDS	1 % (w/v)
	PEG 35000	5 % (w/v)
	HS-DNA	100 µg/ml
	tRNA	100 µg/ml, pH 7,4
<u>Waschlösung 1</u>	SSC	2x

	SDS	0,1 % (w/v)
<u>Waschlösung 2</u>	SSC	0,5x
	SDS	0,1 % (w/v)
<u>Waschlösung 3</u>	SSC	0,1x
	SDS	0,5 % (w/v)
<u>TBE-Puffer</u>	Tris-Base	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	2 mM
<u>5x Ladepuffer DNA</u>	Glycerin	20 % (v /v)
	Bromphenolblau	0.125 % (w/v)
	Xylencyanol	0,125 % (w/v) in 1xTBE
NP40- Puffer	NP40	1 %(w/v)
SDS-Lyse-Puffer	SDS	1 % (w/v)
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA-Na-2H <sub>2</sub> O	2 mM, pH 8,0
<u>2x Laemmli-Puffer</u>	Tris-HCl	100 mM
	Glycin	20 % (v/v)
	SDS	8 % (w/v)
	Mercaptoethanol	10 % (v/v), pH 8,0
<u>SDS-PAGE-Laufpuffer</u>	Tris-HCl	1,5 % (w/v)
	Glycin	9,4 %(v/v)
	SDS	0,5 %(w/v)
<u>Blotting-Lösung 1</u>	Tris-HCl	0,3 M
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Blotting-Lösung 2</u>	Tris-HCl	0,025 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Blotting-Lösung 3</u>	Tris-HCl	0.04 M
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Ponceau-Lösung</u>	Ponceau-Rot	0,1 %(w/v)

	CH <sub>3</sub> COOH	5 % (v/v)
<u>Blotto-Lösung</u>	Tris-HCl	50 mM
	Triton 100	0,1 % (v/v)
	NaCl	150 mM
	Milchpulver	1 % (w/v)
<u>Coomassie-Lösung</u>	Coomassie-Blau	0,4 % (w/v)
	Methanol	50 % (v/v)
<u>Entfärber</u>	Methanol	25 % (v/v)
	CH <sub>3</sub> COOH	7,5 % (v/v)
<u>FACS-AKV</u>	Venimmun	10 % (v/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,1 % (w/v), in PBS
<u>FITC-Puffer</u>	HEPES	10 mM
	NaCl	150 mM
	KCl	5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
<u>Einbettmedium (Nairn)</u>	A) in 10 ml	
	NaVeronal	1,03 g
	NaCl	0.62 g
	NaN <sub>3</sub>	0,1g, pH 8,6
	A) mit Glycerin mischen(1:1), 1g Phenylendiamin zugeben	
<u>TFB I</u>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>	30 mM
	RbCl	100 mM
	MnCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	50 mM
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v), pH 5,8
<u>TFB II</u>	Pipes	10 mM
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	75 mM
	RbCl	10 mM

<u>MP-Lösung A</u>	Glycerin	15 % (v/v), pH 6,5
	Tris	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	Saccharose	0,25 M, pH 7,5
<u>MP-Lösung B</u>	PMFS (vor Gebrauch)	1 mM
	Tris	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	NaCl	80 mM
	Triton X 100	1 %, pH 8,0

### 2.1.13 Weitere Materialien

Whatman-Papier, Protran-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon-Positiv-Membran	Appligene, Heidelberg
Nickspin-columns	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationscuvetten	Invitrogen, Leek, Niederlande
Multiwell-Objektträger	ICN Biomedicals, Meckenheim
Filme, Filmkassetten mit Verstärker	NEN Life Science Products, Boston, USA

**2.1.14 Geräte**

Durchflusszytometer FACSort	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektroporator Gene-Pulser	Biorad, München
Photometer DU640	Beckman, Fullerton, USA
Sequenzierer ABI 310	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Filmentwickler Crurix 60	Agfa-Gevaert, München
UV-Dokumentation The Imager	Appligene, Heidelberg
Gelkammer	Biorad, München
Thermocycler PTC-200	MJ, Watertown, USA
Flüssigkeitsscintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt/Main

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorarbeiten

Die hier genannte Methode ist zum Verständnis der vorliegenden Arbeit von grundlegender Bedeutung und wird daher kurz dargestellt.

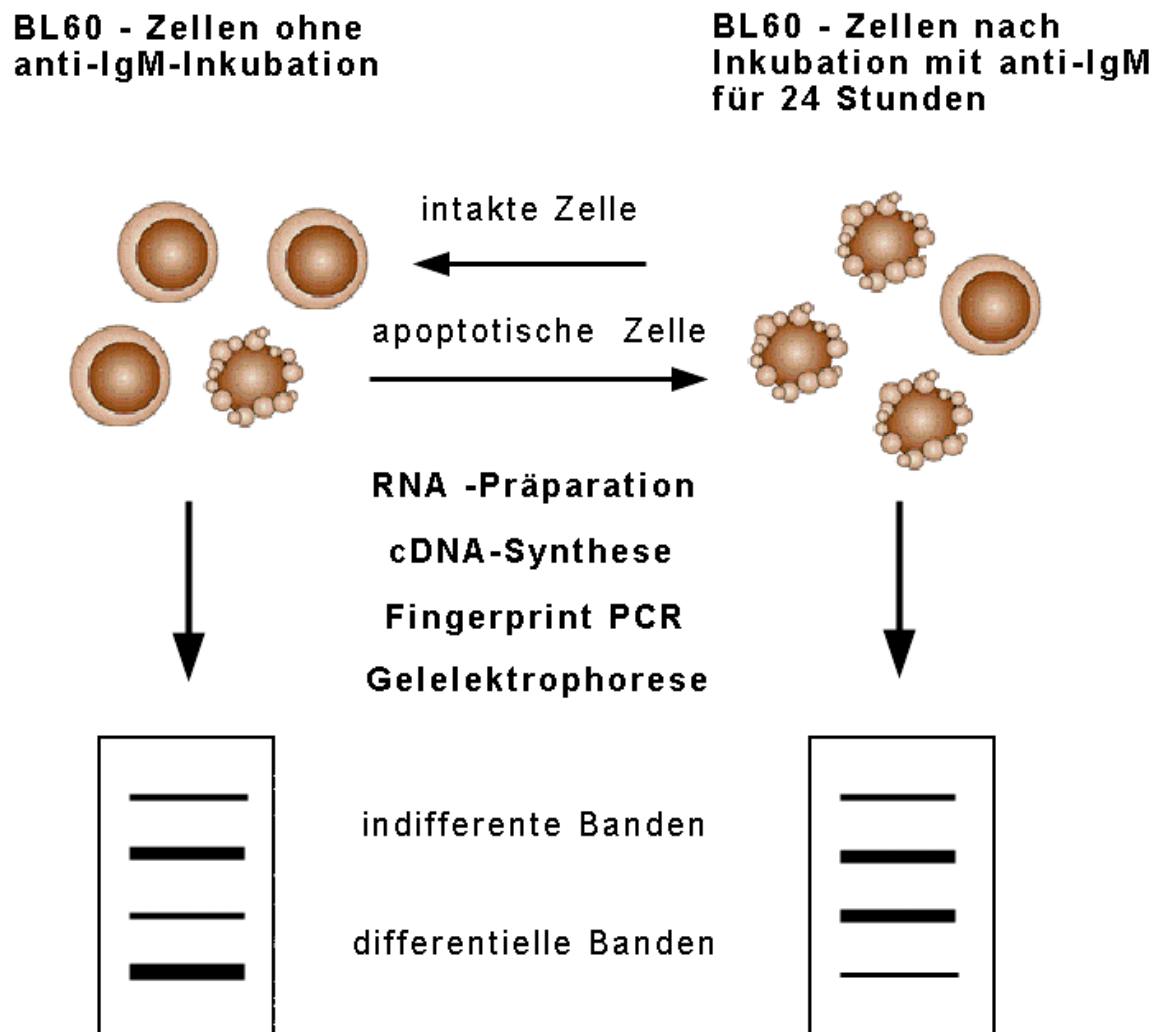
#### 2.2.1.1 *Differential Display RT-PCR*

Das Verfahren der Differential Display RT-PCR wurde 1992 von Liang und Pardee als Methode zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen entwickelt ([Liang and Pardee, 1992](#); [Matz and Lukyanov, 1998](#)). Das Grundprinzip der Methode besteht in der vergleichenden Analyse der Genexpression zweier Zellpopulationen unter Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion. Die hier verwandte Methode stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen DD RT-PCR dar und ist als Delta RNA Fingerprint System (Clontech) kommerziell erhältlich.

Als Ausgangsmaterial wird die RNA der zu vergleichenden apoptotischen und nichtapoptotischen Zellpopulationen eingesetzt. Unter Verwendung von oligo-dT Primern erfolgt die Umschreibung der mRNA in einsträngige cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase. Im Anschluss daran wird die cDNA mittels PCR amplifiziert (Fingerprint-PCR). Dabei können 10 P-Primer (Länge: 25 Nukleotide) mit 9 T-Primern (Länge: 29 Nukleotide) zu je einem Primerpaar kombiniert werden. Unter Zugabe von [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP sowie Taq-Polymerase erfolgt die Amplifikation in insgesamt 25 Zyklen. Zur Kontrolle werden pro Primer-Paar und Zellpopulation zwei cDNA-Ansätze amplifiziert. Die dabei entstehenden PCR-Produkte sind in der Regel zwischen 100 bp und 2000 bp gross. Die PCR-Ansätze werden danach durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (5% Polyacrylamid, 8M Harnstoff) aufgetrennt (max. bis 700 bp) und die entsprechenden Banden der Amplifikationsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Intensität von Banden korrespondierender Ansätze der beiden Populationen wird verglichen und bei differentiellen Banden die jeweils stärkere Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Um eine grössere Menge an DNA zu erhalten, ist eine Reamplifikation mit der jeweiligen Primerkombination notwendig. Nach Aufreinigung der



PCR-Produkte (Qiaex, Qiagen) stehen diese für die Klonierung zur Verfügung. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über die Vorarbeiten.



**Abbildung 4** Übersicht der Vorarbeiten

### 2.2.2 Zellkultur

BL60-2-Zellen werden in RPMI1640-Medien mit entsprechenden Zusätzen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert, die Zelldichte soll 5x10<sup>5</sup>Zellen/ml nicht überschreiten. Der Zusatz von α-Thioglycerol (TG) verbessert die Proliferationsrate durch Bildung von L-Cystein, Bathocuproin-Säure (BCS) verhindert als Calciumchelator die Calcium-abhängige Autooxidation von Thiolen wie TG. Zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (-196°C) werden Aliquots zu 1 ml mit 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml in 80% FCS und 20% DMSO eingefroren. Nach zügigem Auftauen (3min, 37°) werden die Zellen in 10 ml Medium

aufgenommen, abzentrifugiert (10 min, 500x g) und in Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (1:10 in PBS) versetzt und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt

### **2.2.3 Induktion und Nachweis von Apoptose**

Zur Auslösung von Apoptose wird die BL60-2-Zellsuspension eingestellt auf  $10^6$  Zellen/ml und mit (Endkonzentration 1,5 µg/ml) inkubiert. Die Apoptoserate von anti-IgM-stimulierten Zellen und unstimulierten Zellen wird nach 24 h mikroskopisch durch die Auszählung der fragmentierten Kerne bestimmt. Acridin-Orange interkaliert in DNA - Doppelstränge und fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht. Zur Anfärbung werden auf einem Objektträger 20 µl Zellsuspension mit 2 µl Acridin-Orange-Lösung versetzt, danach erfolgt die Auszählung von mindestens 100 Zellen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen an einer Zellpopulation ist die Durchflusszytometrie. Hierbei wird die Expression von Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche apoptotischer Zellen durch FITC-markiertes, mit hoher Affinität Phosphatidylserin bindendes Annexin nachgewiesen und der Anteil PS-positiver Zellen quantifiziert. Da auch nekrotische Zellen PS exprimieren, wird mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt. PI wird von nekrotischen Zellen aufgenommen (PI positiv), aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht von apoptotischen (PI negativ). Zur Färbung werden  $5 \times 10^5$  Zellen abzentrifugiert (10 min, 500x g), in 200 µl FITC-Puffer resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 50 µl FITC-Puffer aufgenommen. Die Zellen werden mit 5 µl Annexin-FITC und 5 µl PI inkubiert (20 min, RT), anschliessend werden mittels FACSort-Durchflusszytometer 10.000 Zellen analysiert (s.u.).

### **2.2.4 Magnetische Separation und Depletion**

Ein Merkmal apoptotischer Zellen ist die Expression von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Dieser Unterschied zu nicht-apoptotischen Zellen wird bei magnetischen Trennungsvorgängen ausgenutzt: Zur Gewinnung einer möglichst reinen Population apoptotischer BL60-2-Zellen, deren Anteil an der Gesamtpopulation 24 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM 50% -70% beträgt, werden die Zellen mit Annexin-FITC, das an PS bindet, sowie mit anti-FITC-gekoppelten paramagnetischen Partikeln (beads) inkubiert. Beim anschliessenden Durchlaufen einer Säule, die sich in einem magnetischen Feld befindet, werden die beads-gekoppelten Zellen zurückgehalten und

so von den durchlaufenden, nicht-apoptotischen Zellen getrennt. Dadurch gelingt es, den Anteil apoptotischer Zellen auf 95% zu erhöhen. Die spontane Apoptoserate von BL60-2-Zellen in der Zellkultur beträgt ca. 5%. Zur Entfernung dieser Zellen aus der Kontrollpopulation wird wiederum mit Annexin-FITC und anti-FITC-beads inkubiert und der Ansatz über eine magnetisierte Säule gegeben. Die in der Durchlauf-Fraktion vorhandenen nichtapoptotischen Zellen werden so von den in der Säule verbleibenden apoptotischen Zellen getrennt.

### **2.2.5 Gesamt-RNA-Präparation mittels Dichtegradientenzentrifugation**

$5 \times 10^7$  Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 500 g), danach wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 2ml Guanidinium-Lösung durch resuspendiert. Weitere 7,5 ml Guanidinium-Lösung werden dazugegeben und der Ansatz wird gemischt, bis eine klare Lösung entsteht. Die so lysierten Zellen werden mit einer 10 ml-Spritze und aufgesetzter Kanüle (0,90x70) mehrmals resuspendiert, wodurch die enthaltene DNA geschert wird. In ein Zentrifugationsröhrchen (12ml) werden 2,6ml Cäsiumchloridlösung vorgelegt, das Lysat wird vorsichtig darüber geschichtet und der Ansatz in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (22 h, 150000x g, 18°C). Der Überstand wird abgenommen, das RNA-Pellet wird getrocknet und zur Fällung in 360µl TE-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 40 µl Natriumacetat (3M) sowie 1ml Ethanol (100%) gemischt, für 30min inkubiert (-80°C) und anschliessend pelletiert (30min, 10000g, 4°C). Nach Abnehmen des Überstandes wird das RNA-Pellet in 100µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und nochmals mit Natriumacetat (3M, 12µl) und Ethanol (100%, 278µl) gefällt (30min, -80°C). Nach erneutem Abzentrifugieren wird das Pellet 2 mal mit 500µl Ethanol (70%) gewaschen und anschliessend in 200µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Messung der RNA-Konzentration wird die RNA aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.6 Messung der RNA-Konzentration

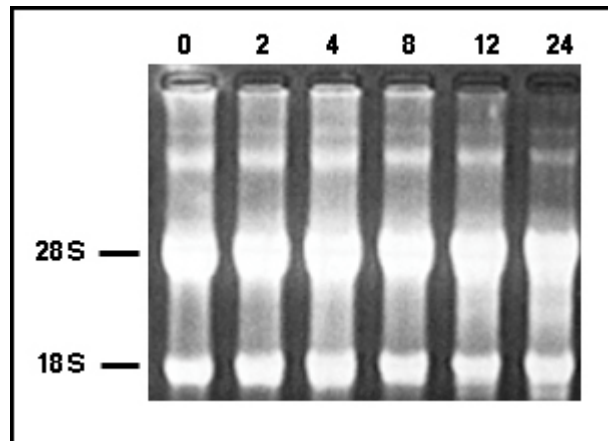
Die RNA wird 1:50 verdünnt und photometrisch wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Bei 260nm und einer OD von 1 beträgt die Konzentration an einzelsträngiger RNA 40 µg/ml. Die Konzentration  $c$  (µg/µl) berechnet sich demnach als

Gleichung (1)  $c = A_{260} \times 40 \times 50$ .

Zur Bestimmung der Reinheit der präparierten RNA wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  gebildet. Dieser liegt bei reiner RNA, d.h. bei geringer Proteinkontamination, um 2,0.

### 2.2.7 Northern Blot

Beim Northern Blot werden RNA-Moleküle in einem denaturierenden Agarose-Gel elektrophoretisch ihrer Grösse nach aufgetrennt und anschliessend auf eine Membran transferiert. Zur Präparation des Agarose-Gels wird Agarose (Endkonzentration 1,2 %) in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht und im Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Unter dem Abzug werden dann 10xMOPS (Endkonzentration 1x) sowie Formaldehyd (37 %, Endkonzentration 0,4 M bzw. 1.11 %) hinzugefügt, gemischt und in die Gelbox (10x15cm) gegossen. Nach dem der Gelkamm eingesteckt ist, bleibt das Gel für 30 min zum Aushärten stehen, wird dann in die Gelkammer eingesetzt und mit 1xMOPS-Puffer bedeckt. 10 µg RNA werden in insgesamt 11 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, dazu werden 39 µl RNA-Premix, 10 µl RNA-Ladepuffer sowie 2 µl Ethidiumbromid gegeben. Die im Ansatz enthaltene RNA wird denaturiert (15min, 55°C), kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Die Gelelektrophorese läuft bei konstanter Spannung (70 V) und einer Stromstärke zwischen 80 und 100 mA. Nach 20 min wird zusätzlich der Anoden- und Kathodenpuffer kontinuierlich umgepumpt. Insgesamt wird die RNA in ca. 3 Stunden aufgetrennt. Die Dokumentation der Auftrennung erfolgt photographisch nach Anregung des in die RNA intercalierten Ethidiumbromids durch UV-Licht. Ein Lineal wird an das Gel angelegt und mitphotographiert, um die Abstände der sichtbaren RNA-Fraktionen (28S, 18S sowie 5,8S) bestimmen zu können (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Elektrophoretische Auftrennung von RNA. BL60-2-RNA aus Zellen ohne Inkubation ( 0 ) und nach Inkubation mit anti-IgM ( 2, 4, 8, 12, 24 Stunden Inkubation). RNA Blot. 18S/28S: rRNA.

Das Gel wird für 15min in 20x SSC gebadet, anschliessend wird die RNA über Nacht auf eine Nylon-Membran geblottet. Nach Trocknen der Membran wird die RNA durch UV-Strahlung (120 mJ) auf der Membran fixiert und unter UV-Licht werden die sichtbaren RNA-Banden dünn mit Bleistift markiert ([KroczeK,1993](#)).

### 2.2.8 Herstellung radioaktiv-markierter DNA- und RNA-Proben

Zur Generierung radioaktiv-markierter DNA-Sonden wird das High-Prime-labeling-Verfahren (Boehringer-Mannheim) nach Herstellerangaben angewandt. Die Abtrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente von freien Nukleotiden und Oligonukleotiden (<20 Nukleotide) wird mit vorgefertigten Sephadex-G50-Säulen (Nick-Spin-Columns, Pharmacia) durchgeführt.

Radioaktiv-markierte RNA-Sonden werden durch *in vitro*-Transkription (Riboprobe-System, Promega) hergestellt. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20µl) wird entsprechend den Hersteller-Angaben mit 1 µg linearisiertem Plasmid und 5 µl [ $\alpha$  -  $^{32}$ P] UTP gemischt und inkubiert (60 min, 37°C). Die Abtrennung freier Nukleotide von den RNA-Sonden erfolgt durch Ethanol-Fällung. Dazu werden zu 20µl Reaktionsansatz 10µl Ammoniumacetat (7,5 M) sowie 50 µl Ethanol (100%) gemischt und inkubiert (30 min, -80°C), anschliessend wird der Ansatz zentrifugiert (5 min, 12000 g). Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet in 100 µl Ammoniumacetat (7,5 M) sowie 250 µl Ethanol (100%) resuspendiert und erneut gefällt (30 min, -80°C). Nach Zentrifugation wird das Sonden-Pellet in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.9 Bestimmung der Radioaktivität markierter DNA- und RNA-Sonden**

Die Bestimmung der Aktivität einer Probe dient der groben Abschätzung der Einbaurate radioaktiver Nukleotide in die synthetisierten Sonden. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität (Zerfälle pro Minute, cpm) wird ein Aliquot der Sondenlösung (1 µl) in ein spezielles Plastikgefäß überführt und nach Cerencov-Protokoll im Szintillationszähler gemessen. Sondenansätze mit einer Aktivität grösser als  $1 \times 10^4$  cpm/µl sind ausreichend markiert, wobei durch den effizienteren Einbau von  $[\alpha^{32}\text{P}]$  UTP-Nukleotiden bzw. durch eine allgemein bessere Syntheseleistung die Aktivität der RNA-Sonden höher ist als die der DNA-Sonden ( $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  cpm/µl).

### **2.2.10 Northern-Blot-Hybridisierung**

Die Membran mit der geblotteten RNA wird in 5 ml Hybridisierungspuffer für eine Stunde bei 52°C im Hybridisierungssofen inkubiert (Prähybridisierung). Die aufgereinigten DNA-Sonden werden nach Denaturierung (5 min, 95°C) in 5 ml Hybridisierungspuffer gegeben und gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Der Blot wird bei 52°C über Nacht (16-24 h) inkubiert, anschliessend wird nach Abgiessen der Hybridisierungslösung die Membran gewaschen (Waschlösung1: 15 min, RT; Waschlösung2: 15 min, RT; Waschlösung3: 15 min, 68°C). Die RNA-Sonden werden ebenfalls in 5 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und nach Abgiessen der Prähybridisierungslösung zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 60°C, danach wird der Blot wie oben beschrieben gewaschen. Nach den Waschschritten wird die Membran nach kurzem Abtropfen in einen Plastik-Beutel eingeschweisst, in eine Filmkassette mit Intensivierungsfolie gelegt und zusammen mit einem aufgelegten Röntgenfilm bei -80°C über Nacht gelagert. Die von den radioaktiven,  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -markierten Sonden ausgehende Strahlung führt zur Schwärzung des Films. Die Dauer der Exposition kann zwischen 10 Stunden und mehreren Tagen variieren.

### 2.2.11 Herstellung von polyA<sup>+</sup> - mRNA

Zur Herstellung von mRNA wird das PolyA-Tract-System IV (Promega) benutzt. Dazu werden nach Herstellerangaben 1 mg Gesamt-RNA mit biotinyliertem Oligo-dT-Primer inkubiert, über Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel wird dann die Primer-markierte mRNA von der restlichen RNA getrennt. Nach Fällung mit 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M) und 1,0 Volumen Ethanol (100%) sowie Waschen mit 1 ml Ethanol (75%) wird das mRNA-Pellet Vacuum-getrocknet, in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.12 Herstellung einzelsträngiger cDNA

Die Synthese von einzelsträngiger cDNA aus Gesamt-RNA wird mit dem Superscript Preamplification System durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers wird aus 5µg RNA mit Oligo-dT-Primern und 200U Reverse Transkriptase mRNA synthetisiert und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Vervielfältigung von einzel-/doppelsträngiger DNA, wie z.B. Plasmiden, wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benutzt.

DNA (1-50 ng/µl)	2 µl
Primer 1 (5 µM)	2 µl
Primer 2 (5 µM)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
TaqPol (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	34,5 µl

Die PCR-Bedingungen sind durch entsprechende Annealing (Primer-Anlagerung)-Temperaturen den jeweiligen Primern angepasst:

Schritt 1	Denaturierung	5 min	95°C
Schritt 2	Denaturierung	1 min	92°C
Schritt 3	Primeranlagerung	1,5 min	50 - 65°C
Schritt 4	Synthese	2 min	72°C
Schritt 5	29x zu Schritt 2		
Schritt 6	Auffüllen	5 min	72°C

## **2.2.14 Klonierung von PCR-Produkten**

### *2.2.14.1 Ligation*

Als Voraussetzung für weitere Anwendungen (*in vitro*-Translation, *in vitro*-Transkription, Sequenzierung) ist es sinnvoll, mit definierten DNA-Fragmenten zu arbeiten. Dazu werden PCR-Fragmente in Plasmid-Vektoren ligiert, die Ligationsprodukte werden in Bakterien transferiert und nach Anzucht werden Bakterienkolonien isoliert, die jeweils Plasmid-Konstrukte einer Ausgangszelle tragen. Zur Klonierung von PCR-Produkten wird der Vektor pGEM-T verwandt, der linearisiert vorliegt und an seinen 3'-Enden einzelne, überhängende Thymidin-Nukleotide besitzt. Da die Taq-Polymerase während der PCR unspezifische Adenosin-Nukleotide an die 3'-Enden der PCR-Produkte anhängt, können diese mit pGEM-T ligiert werden:

T4 DNA - Ligase 10xPuffer	2 µl
pGEM – T - Vektor (50 ng)	1 µl
PCR - Produkt	1 - 5 µl
T4 DNA - Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O zu	20 µl



Der Ansatz wird bei 16°C für 12 h – 16 h inkubiert. Eine verbesserte Ligationsrate wird durch kurzzeitiges Erwärmen (1 min, 50°C) von pGEM-T-Vektor und Insert (PCR-Produkt) vor Zugabe der restlichen Zusätze erreicht. Die Berechnung der eingesetzten Menge an PCR-Produkt erfolgt nach Gleichung (2):

$$\text{Gleichung (2): } m_{\text{Insert}} = (m_{\text{Vektor}} L_{\text{Insert}} / L_{\text{Vektor}}) (R_{\text{Insert/Vektor}})$$

mit der Masse  $m$  (ng), der Fragmentlänge  $L$  (bp) eines Fragments sowie dem gewünschten molaren Verhältnis  $R$  von Insert und Vektor.

#### 2.2.14.2 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitze-Schock; $\alpha$ -Komplementierung

Um die Aufnahme freier DNA durch *E. coli* zu ermöglichen, werden die Bakterien durch Vorbehandlung Aufnahme-kompetent gemacht. Dazu werden 10 ml eines Kulturansatzes (16 h, 37°C) in 100 ml LB-Medium gegeben und kultiviert bis zu einer  $OD_{580}$  von 0,5, bei der sich die Bakterien zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Danach werden die Zellen abgekühlt (5 min, Eis) und pelletiert (10 min, 2500x g, 4°C), alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C. Das Pellet wird in 40 ml TFB I resuspendiert, 5 min in Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 2500x g, 4°C), resuspendiert (4 ml TFB II) und in Eis für 5 min inkubiert. Nach Aliquotierung (200  $\mu$ l) in vorgekühlte Eppendorfgefäße werden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Ein Aliquot kompetenter Zellen (50  $\mu$ l) wird auf Eis aufgetaut, zu 2  $\mu$ l Ligationsansatz gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschliessend wird der Ansatz für exakt 50 s auf 42°C erhitzt, 2 min bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 50 min bei 37°C geschüttelt. LB-Agar-Platten werden mit IPTG (4  $\mu$ l, Stock-Lösung 200 mg/ml) und X-Gal (40  $\mu$ l, Stock-Lösung 20 mg/ml) behandelt und bei 37°C vorgewärmt. Nach Zentrifugation (5 min, 5000x g) wird das Pellet in 50  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien werden auf Ampicillin-haltige LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch  $\alpha$ -Komplementierung werden Bakterienkolonien (Klone) identifiziert, die ein Plasmid mit Insert tragen (weisse Kolonien) bzw. lediglich den religierten Vektor enthalten (blaue Kolonien) ([Sambrook et al., 1989](#)).

### 2.2.14.3 Minipräparation und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Um die Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, wird mit dem Qiaprep-System gearbeitet. Nach Anzucht einer Übernacht-Kultur (2 ml, 37°C) werden die Bakterien entsprechend Hersteller-Protokoll (Miniprep) alkalisch lysiert, das Lysat wird neutralisiert, auf eine hohe Salzkonzentration eingestellt und auf eine aus anorganischen Siliziumverbindungen bestehende Säule gegeben. Dort bindet selektiv die Plasmid-DNA und kann nach mehreren Waschschritten mit H<sub>2</sub>O eluiert werden. Um grössere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wird nach dem für die Minipräparation geschilderten Prinzip DNA aus 100ml (Bakterienstämme mit hoher Plasmid-Anzahl) bzw. aus 500ml (Niedrige Plasmidzahl) Übernacht-Kultur gewonnen.

### 2.2.15 Messung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wird photometrisch durchgeführt (siehe RNA-Konzentrationsbestimmung). Bei einer Wellenlänge von 260nm und einer OD von 1 beträgt die Konzentration doppelsträngiger DNA 50µg/ml. Die Konzentration  $c$  (µg/µl) einer DNA-Lösung lässt sich unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors  $F_V$  mit Gleichung (3) berechnen:

Gleichung (3)  $c = A_{260} \times 50 \times F_V$ .

Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wird ausserdem die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  gebildet, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

### 2.2.16 Restriktionsverdau

Das Insert kann durch Restriktionsendonukleasen aus dem Gesamtplasmid herausgetrennt werden. Für Kontroll-Restriktionen reichen wenige ng (10 - 20) Plasmid-DNA aus. Der Restriktionsansatz wird aus DNA, Enzym - kompatibellem Puffer sowie den entsprechenden Enzymen (1U pro µg DNA) hergestellt und bei einer dem Temperatur-optimum der Enzyme entsprechenden Temperatur für eine Stunde inkubiert.

### 2.2.17 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Gesamtladung elektrophoretisch der Grösse nach aufgetrennt werden. Entsprechend der erwarteten Fragment-Grösse werden dazu Agarose-Gele unterschiedlicher Konzentration benutzt. Bei Fragmenten zwischen 200 und 5000 bp z.B. werden 1,2% - ige Gele verwandt, die Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) enthalten. Durch die Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht können die aufgetrennten Fragmente sichtbar gemacht und photographiert werden, anhand des DNA-Markers wird ihre Grösse bestimmt.

### 2.2.18 DNA - Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgen mit dem System ABI-310, basierend auf dem Sanger-Prinzip. Das Plasmid oder die PCR-Produkte werden denaturiert, anschliessend werden Fragmente hergestellt, die mit modifizierten Didesoxy-Nukleotiden markiert sind. Die Fragmente werden elektrophoretisch in einem Kapillarsystem aufgetrennt, so dass für jede Position der Ausgangssequenz ein spezifisch markiertes Fragment vorliegt. Durch Messung der laserinduzierten Fluoreszenz der Fragmente beim Austritt aus der Kapillare wird die Basenabfolge bestimmt. Die DNA-Sequenzen wurden anschliessend mit nichtredundanten Datenbanken (NCBI) unter Verwendung des BLAST-Algorithmus verglichen ([Altschul et al., 1990](#)).

### 2.2.19 Präparation von Gesamtprotein

Zur Gewinnung von Gesamtprotein werden die Zellen mit Lämmli-Puffer lysiert und kurz denaturiert (5 min, 90°C). Das Lysat wird direkt für Protein-Gelelektrophorese benutzt. Mittels SDS-Lyse-Puffer kann ebenfalls Gesamtprotein aus Zellen gewonnen werden. Dazu wird ein Zellpellet von  $5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl SDS-Lyse-Puffer (auf 80°C vorgewärmt) resuspendiert, inkubiert (15 min, 95°C) und zentrifugiert (15 min, 12000xg). Der Überstand enthält die Proteine und kann bei -20°C eingefroren werden.

### 2.2.20 Protein-Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen werden mit dem BCA Protein Assay bestimmt. Nach Angaben des Herstellers wird die Protein-Probe mit BCA Reagenz inkubiert und nach Erstellen einer Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen (Rinderserum-Albumin) erfolgt die photometrische Messung der proportional zur Proteinkonzentration gebildeten  $\text{BCA-Cu}^{1+}$ -Komplexe bei einer Wellenlänge von 562nm ( $A_{562}$ ).

### 2.2.21 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden 2 Gele (Sammel- und Trenngel), die sich in der Acrylamid-Konzentration sowie im pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet. Sammelgel (5%) und Trenngel (10-15%) werden nach Sambrook hergestellt ([Sambrook, 1989](#)). Die Polymerisierung erfolgt ausgehend von Acrylamid (monomer) und Bisacrylamid (bifunktional) und wird durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Das Gel wird in die Gelkammer eingespannt und mit SDS-PAGE-Laufpuffer bedeckt. Die Proteinproben, in Lämmli-Puffer aufgenommen und kurz aufgekocht (5min, 90°C), werden in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 80 V bis 150 V. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel entsteht zunächst eine scharfe Protein-Bande, im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung der Proteine.

### 2.2.22 Western Blot

Der Transfer von Proteinen auf eine (Nitrozellulose-) Membran und der Nachweis membrangebundener Proteine mit entsprechenden Antikörpern wird als Western-Blot-Verfahren bezeichnet. Zum Proteintransfer wird ein elektrophoretisches Blotverfahren benutzt, die verwendete Apparatur (Blotter) besteht aus zwei Graphit-Platten (Anode und Katode). Die Anode wird mit Blotting-Lösung 1 befeuchtet und mit drei Lagen Whatman-Papier (in Blotting-Lsg. 1 getränkt) sowie zwei weiteren, mit Blotting-Lsg. 2 getränkten Lagen Papier bedeckt. Auf die ebenfalls mit Lsg. 2 angefeuchtete Nitrozellulose-Membran wird das Proteingel gelegt. Bedeckt wird das Gel mit 5 Lagen Whatman-Papier (Blotting-Lösung 3) und der Katoden-Platte. Der Transfer erfolgt bei einer Spannung von 20 V für 90 min. Anschliessend wird die Membran für 2 min in Ponceau-Lösung gefärbt. Die Banden des Proteinmarkers werden auf der Membran

gekennzeichnet und die Membran wird zwischen zwei Lagen Whatman-Papier getrocknet. Die Nitrozellulose-Membran wird zur Absättigung von Proteinbindungsstellen in Blotto-Lösung gebadet (3 h, RT oder über Nacht, 4°C). Dann wird der 1. Antikörper, in Blotto-Lsg. verdünnt (1:5000 - 1:20000), zur Membran gegeben und die Membran für 90 min in der Lösung inkubiert. Nach 3 Waschschritten (5 min in Blotto-Lösung) wird der 2. Antikörper in vom Hersteller angegebener Verdünnung mit der Membran inkubiert. Die Detektion wird mit dem ECL System durchgeführt, entsprechend den Herstellerangaben wird der Blot mit der ECL-Lösung inkubiert und anschliessend ein Röntgenfilm aufgelegt. Das am 2. Antikörper fixierte Enzyme erzeugt durch Substrat-Umsatz Chemilumineszenz, die zur Schwärzung des Röntgenfilms führt.

### **2.2.23 Membranpräparation aus BL60-2-Zellen**

Zur Isolation von membranhaltigen Zellbestandteilen werden  $10^7$  Zellen pelletiert, in 1ml MP-Lösung A resuspendiert und 5 Min. im Douncer zerkleinert. Nach Zentrifugation (10min, 1000x g, 4°C) wird der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (10min, 10.000x g, 4°C). Der Überstand wird anschliessend ultrazentrifugiert (45 min, 100.000x g). Nach Abnehmen des Überstandes (Kontrollfraktion) wird das verbliebene Pellet in 500 µl MP-Lösung 2 (+ 5 µl 100mM PMSF) resuspendiert, homogenisiert (Kanülen Grösse 18) und erneut ultrazentrifugiert (45 min, 100.000x g). Der Überstand wird abgenommen und es wird die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.2.24 Expression klonierter cDNA in BL60-2 - Zellen**

Zur Expression klonierter cDNA's werden die entsprechenden cDNA-Fragmente in die Plasmid-Vektoren pREP9 oder pEBV-His kloniert. Da sich diese Vektoren in der Zielzelle unabhängig vom Zellzyklus replizieren und nicht in das zelleigene Genom integrieren, werden sie als episomal-stabile Vektoren bezeichnet. Für die Elektroporation von Zellen der BL60-2-Linie werden die Zellen 24 h vor Beginn der Transfektion auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt, um gute Proliferationsvoraussetzungen zu schaffen. Pro Transfektionsansatz werden  $5 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert, in 500 µl RPMI 1640 - Medium (ohne Zusätze) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 - 50 µg DNA wird der Ansatz 5 min bei RT inkubiert, in die Elektroporationsküvetten (d = 0,4 cm) umgefüllt und kurz aufgeschüttelt. Die Elektroporation erfolgt bei  $U_{\max} = 250$  V,  $C=960$  µF und RT, die Ansatz-spezifische Zeitkonstante T beträgt zwischen

15ms und 20ms, der Widerstand R demnach zwischen 15,6 Ohm und 20,83 Ohm. Anschliessend wird die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes (37°C) Kulturmedium umgesetzt. Durch Trypanblau-Färbung wird die Anzahl abgestorbener Zellen ermittelt.

#### **2.2.25 Ficoll-Aufreinigung**

Da bei der Elektroporation ca. 30-50% der in der Zellsuspension vorhandenen Zellen zerstört werden und dies zu Veränderungen des pH-Wertes und anderer Parameter des Mediums führt, ist eine Abtrennung der geschädigten Zellen von den noch intakten Zellen sinnvoll. Zur Auftrennung werden 2 ml Ficoll-Lösung in ein Falcon-Röhrchen vorgelegt und die aufzureinigende Zellsuspension in einem Volumen von 1 ml vorsichtig darüber geschichtet. Der Gesamtansatz wird zentrifugiert (20 min, 300x g, RT) und anschliessend werden die das Interphase-Pellet bildenden, intakten Zellen abgesaugt und in vorgewärmtes Medium überführt.

#### **2.2.26 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist die Expression von GFP (green fluorescent protein) – codierenden Plasmiden. GFP ist ein Protein, das durch die Qualle *Aequorea victoria* produziert wird. Das entsprechende Gen wurde 1992 kloniert ([Prasher et al., 1992](#)) und seitdem in verschiedenen Zellarten exprimiert ([Chalfie et al., 1994](#)). Biophysikalische Grundlage der Fluoreszenz von GFP ist ein chromogenes, posttranslational zyklisiertes und oxidiertes Tripeptid (Ser–Tyr–Gly). In *A. victoria* erfolgt die Aktivierung durch Elektronentransfer von  $\text{Ca}^{2+}$  - aktiviertem Aequorin auf GFP oder allgemein durch UV - bzw. Blaulicht (395 nm bzw. 470 nm), ohne das weitere Cofaktoren notwendig sind. Nach Anregung emittieren die Proteine grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei 509 nm. Um die Expression des Proteins in humanen Zellen zu erhöhen, wurden in der wtGFP-cDNA durch Austausch der entsprechenden Nukleotide Codons generiert, die eine erhöhte Translationseffizienz in humanen Expressionssystemen ermöglichen.

EGFP (enhanced GFP) stellt eine modifizierte Form des wtGFP dar, das neben humanisierten Codons eine verstärkte Fluoreszenz aufweist. Durch Mutationen im Bereich der Tripeptid-Sequenz konnte das Exzitationsmaximum von EGFP auf 490 nm

verschoben werden (red shifted variants). Da die bei der Detektion mit FACS-Geräten bzw. Lasermikroskopen benutzten Argon-Laser das Licht mit einem Maximum von 488 nm abgeben, kann eine stärkere Anregung mit entsprechend höherer Fluoreszenz erreicht werden. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz für die Elektroporation von BL60–2–Zellen wird ein pREP9-EGFP-Konstrukt verwendet. Die Transfektion erfolgt wie oben beschrieben, anschliessend können die Zellen mit Fluoreszenzmikroskop (FITC – Filter, s.u.) oder Durchflusszytomter (Filter FL1, s.u.) analysiert werden.

### 2.2.27 Anreicherung transfizierter Zellen

Zur Anreicherung transfizierter BL60–2–Zellen werden die aufzureinigenden Zellen mit einem pRep9- $\Delta$ CD4-Konstrukt cotransfiziert.  $\Delta$ CD4 kodiert für eine Form des T-Zell-spezifischen Oberflächenantigens CD4, die durch Deletion der entsprechenden cDNA-Abschnitte keine zytoplasmatische, signaltransduzierende Domäne besitzt. Da BL60–2–Zellen kein endogenes CD4 exprimieren, sind nur  $\Delta$ CD4-Transfektanten nach Inkubation mit Anti-CD4-Antikörper CD4-positiv.

Die Anreicherung  $\Delta$ CD4-exprimierender Zellen erfolgt durch immunomagnetische Separation, bei der para-magnetische Partikel (Dynabeads, DYNAL) eingesetzt werden. Für die Anreicherung CD4-positiver BL60–2–Zellen werden  $5 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und in 2 ml PBS-FCS-Medium resuspendiert. 150  $\mu$ l der CD4-gekoppelten Dynabeads ( $1,4 \times 10^8$ /ml, insgesamt ca.  $2 \times 10^7$ ) werden in ein Eppendorf-Gefäss (1,5 ml) überführt und das Gefäss wird in einen Magnetständer gestellt. Nach 2 min wird der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Wandpellet in 2 ml PBS-FCS-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wird 2 mal wiederholt und das Pellet wird in 150  $\mu$ l PBS-FCS-Medium aufgenommen. Die gewaschenen Partikel werden dann mit der BL60–2–Suspension unter ständigem, vorsichtigem Mischen inkubiert (60 min, 4°C), wobei die Partikel in vierfachem Überschuss vorliegen. Anschliessend wird das Reaktionsgefäss in den Magnetständer gestellt, der Überstand nach 2 min vorsichtig entfernt und das Pellet in Medium gewaschen. Nach weiteren 2 Waschschriften kann die Suspension zur Kultur verwandt werden oder es können die Magnetpartikel von den Zellen abgelöst werden. Der hierbei verwendete AK besitzt eine starke Affinität zum beads-gekoppelten anti - CD4 - AK und bewirkt dadurch die Verdrängung des  $\Delta$ CD4-Moleküls aus der Bindung. Dazu wird das Pellet nach dem letzten Waschschrift in 100  $\mu$ l Medium

resuspendiert und 10 µl der Anti-Fab(Anti-CD4)-Lösung zum Ansatz gegeben. Nach Inkubation (60 min, RT) wird nochmals magnetisch separiert, die von den Zellen abgelösten Partikel verbleiben als Pellet und die Zellen können kultiviert werden.

### **2.2.28 Durchflusszytometrie / Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)**

Zur Sortierung und Charakterisierung von Zellen und Zellbestandteilen können immunzytometrische Verfahren benutzt werden. Nach Anregung einzelner Zellen mit Laserlicht definierter Wellenlänge können die Zellen durch Bestimmung der Lichtabsorption und -emission (z.T. nach Inkubation mit markierten Antikörpern) morphologisch und immunologisch analysiert oder sortiert (FACS) werden.

Die immunzytometrische Analyse umfasst 3 Teilschritte: die Markierung der Zellen, die zytometrische Messung und die Datenauswertung. Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen (extrazelluläres FACS) werden  $5 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert, in AKV-Medium (200 µl) aufgenommen, inkubiert (15 min, 4°) und anschliessend abzentrifugiert. Nach Resuspension in AKV-Medium (50 µl) und Zugabe von 5 µl gekoppeltem Antikörper (bzw. entsprechend der Herstellerangaben) wird inkubiert (30 min, 4°C). Als nächstes werden die Zellen 3 mal mit AKV-Medium gewaschen, in PBS-Puffer resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Bei Verwendung von 1. und 2. Antikörper wird noch ein weiterer Inkubationsschritt eingefügt. Die zytometrische Messung (Gerät FACScan) sowie die Datenauswertung (Software CellQuest) ist in den entsprechenden Handbüchern ausführlich beschrieben.

### **2.2.29 Immunfluoreszenz**

Zur mikroskopischen Darstellung von intrazellulären oder extrazellulären Antigenen werden die zu untersuchenden Zellen auf Objektträgern immobilisiert und mit direkter oder indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Dazu werden die Suspensionszellen auf sterile Objektträger (mit mehreren Vertiefungen / multi well) aufgetragen (je Vertiefung 40 µl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) und inkubiert (1 h, 37°C). Anschliessend wird das Medium abgesaugt und die sedimentierten Zellen werden für 3 min luftgetrocknet. Die Zellen werden nun mit 3% Formaldehyd fixiert (5 min, RT), danach mit NP40-Puffer gewaschen (1 min) und permeabilisiert (NP40-Puffer, 10 min). Die jeweiligen Antikörper werden in entsprechender Verdünnung mit den Zellen inkubiert (jeweils 30 min, RT). Nach erneutem Waschen werden die Zellen mit Einbettmedium überschichtet, das



Deckglas aufgelegt und mit Nagellack luftdicht versiegelt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgen im Hellfeld mit Phasenkontrast sowie im Dunkelfeld mit Filtern entsprechend den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen.

### 2.2.30 Radioaktive Markierung von Proteinen

Durch Einbau  $^{35}\text{S}$ -haltiger Aminosäuren werden neu synthetisierte Proteine *in vivo* radioaktiv markiert und sind dadurch autoradiographisch detektierbar. Hierzu werden  $5 \times 10^7$  Zellen in Minusmedium gewaschen, in 20 ml Minusmedium resuspendiert und inkubiert (15 min,  $37^\circ\text{C}$ ). Nach Zentrifugation wird das Zellpellet in 20 ml Minusmedium resuspendiert, dazu werden 100  $\mu\text{l}$  Express Labeling Mix ( $^{35}\text{S}$ -haltiges Methionin, Endkonzentration: 0,05 mCi/ml) gegeben. Nach Inkubation (4 h,  $37^\circ\text{C}$ ) werden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml NP40-Puffer lysiert (20 min, Eis, mehrmals mischen) und zentrifugiert (20 min,  $4^\circ\text{C}$ , 10.000x g). Der Überstand enthält das  $^{35}\text{S}$ -markierte Gesamtprotein.

### 2.2.31 Immunpräzipitation

Die Anreicherung oder Detektion eines definierten Proteins kann durch Immunpräzipitation erfolgen. Dazu wird ein Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, mit Agarose A gekoppelt (30 min, Eis, mehrmals mischen). Anschliessend wird das Konjugat mit NP40 - Puffer (1% in PBS) gewaschen und resuspendiert. Gleichzeitig werden Zellen mit [ $^{35}\text{S}$ ]-haltigen Aminosäuren inkubiert und lysiert (s.o.). Zur Vermeidung unspezifischer Protein-Agarose-Interaktionen sollte eine Vorinkubation des Zell - Lysates mit Agarose A erfolgen. Das Antikörper-Agarose-A-Konjugat wird dann mit vorgereinigtem Zell-Lysat inkubiert (16h,  $4^\circ\text{C}$ , Rotor). Die hierbei entstehenden, an Agarose A gebundenen Protein-Antikörper-Komplexe werden nach mehrmaligem Waschen in Lämmli-Puffer aufgenommen und können mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden autoradiographisch oder mit Western Blot detektiert.

### **2.2.32 Autoradiographischer Nachweis $^{35}\text{S}$ -haltiger Proteine**

Die autoradiographische Detektion von  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinen erfordert aufgrund ihrer geringen Sensitivität eine Vorbehandlung des Proteingels. Nach Fixierung des SDS-Polyacrylamid-Gels in Fixierungslösung (30 min, RT, Schüttler) erfolgt die Inkubation mit Amplify-Lösung (30 min, RT, Schüttler). Anschliessend wird das Gel auf Whatman-Papier getrocknet (Geltrockner: 60 min, 80°C), das Papier in Folie eingeschweisst und mit Röntgenfilm in eine Kassette eingelegt (2 h bis mehrere Tage).

### **2.2.33 Elektronenmikroskopie**

Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Vogel, MDC Berlin, angefertigt.

### **2.2.34 Massenspektrometrie**

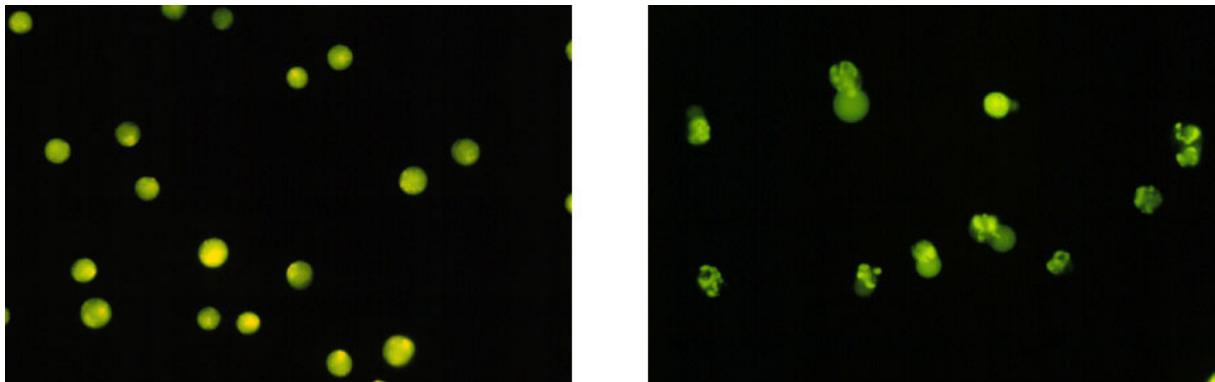
Die tryptische Proteolyse mit nachfolgender Massenspektrometrie wurde von Dipl. - Chemiker Volker Badock, MDC Berlin, durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung Apoptose-assoziiierter Gene und Charakterisierung des Genprodukts LAPTM5

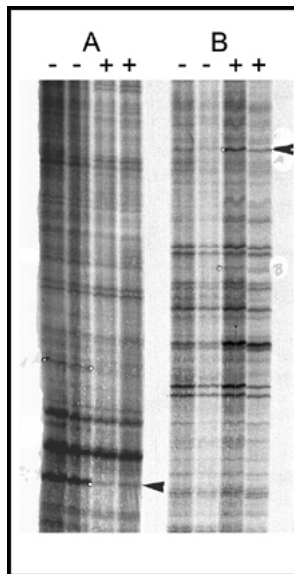
##### 3.1.1 Differential Display RT-PCR

Die anti-IgM-sensitive humane Burkitt-Lymphom-Linie BL60-2 ([Rickers et al., 1998](#)) wurde zur Auslösung von Apoptose für 16 Stunden mit anti-IgM inkubiert, ein Kontrollansatz wurde im gleichen Zeitraum ohne anti-IgM kultiviert. Der Anteil apoptotischer Zellen liegt nach Inkubation mit anti-IgM bei 50 - 70%. In der Kontrollpopulation sterben ca. 5% der Zellen spontan durch programmierten Zelltod. Abbildung 6 zeigt intakte und apoptotische Zellen nach Färbung mit Acridin-Orange.



**Abbildung 6** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld, Färbung mit Acridin-Orange. Links: BL60-2-Zellen vor Induktion von Apoptose. Rechts: 24 Stunden nach Induktion von Apoptose durch Inkubation mit anti-IgM. Acridin-Orange interkaliert in die DNA, wodurch die Zellkerne sichtbar werden. Im linken Bild sind intakte Zellen und Zellkerne zu sehen (nichtapoptische Population), rechts dagegen sind die Kerne deutlich fragmentiert (apoptotische Population).

Aus beiden Zellfraktionen wurde RNA isoliert und unter Verwendung von oligo-dTP-Primer einzelsträngige cDNA hergestellt (Reverse Transkription). Anschliessend wurden aus 10 P-Primern und 9 T-Primern Primer-Paare gebildet und zur Synthese doppelsträngiger cDNA eingesetzt (PCR). Zur Objektivierung der Ergebnisse wurden jeweils 2 Ansätze pro Zellfraktion amplifiziert. Die Differential Display RT-PCR ist im Labor etabliert und wurde von Andreas Laubersheimer ausgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschliessend elektrophoretisch aufgetrennt (denaturierendes Gel, 8M Harnstoff) und autoradiographisch analysiert (Abb. 7).

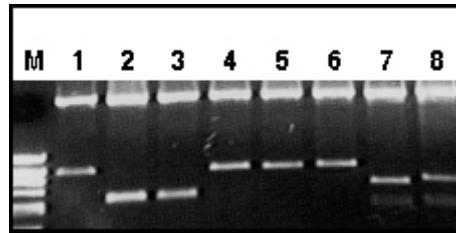


**Abbildung 7** Elektrophoretische Auftrennung von DD RT-PCR-Fragmenten

Banden von RT-PCR-Produkten, deren Intensität Unterschiede zwischen den Zellfraktionen zeigten, wurden aus dem Gel eluiert. Als potentiell differentielle Banden wurden diejenigen zur weiteren Analyse ausgewählt, die jeweils in beiden amplifizierten Ansätzen unterschiedliche Intensitäten gleicher Tendenz (Zunahme oder Abnahme der Intensität) aufwiesen. Insgesamt wurden 38 Banden-Paare mit einer eindeutigen Intensitätsänderung identifiziert. Die jeweils stärkeren Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Anschliessend erfolgte die Reamplifikation mit den in der DD RT-PCR benutzten Primern. Die Länge der entsprechenden PCR-Produkte lag zwischen 100bp und 700bp.

### 3.1.2 Klonierung und Sequenzanalyse von RT-PCR-Produkten

Nach Reamplifikation und Aufreinigung der RT-PCR-Produkte wurden diese in den Vektor pGEM-T kloniert und in *E. coli* transformiert (JM 109). Die Klonierung erfolgte vor allem, um spätere Experimente effizient durchführen zu können, z.B. durch Verwendung einheitlicher Primer bei Sequenzierungen. Von den ausgewählten 38 Reamplifikaten konnten 30 kloniert werden, bei den restlichen 8 gelang dies nicht. Pro Klonierung wurden 8 Kolonien isoliert, da aus Vorversuchen bekannt war, dass die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden unterschiedliche PCR-Produkte enthalten können. Die selektierten Klone wurden über Nacht kultiviert und die enthaltene Plasmid-DNA präpariert. Der anschliessende Kontrollverdau ergab wie erwartet ein inhomogenes Fragmentmuster (Abbildung 8).



**Abbildung 8** Beispiel für Kontrollverdau nach Klonierung von DD RT-PCR-Produkten. Die ursprüngliche PCR-Bande muss entsprechend dem inhomogenen Bandenmuster mindestens 3 unterschiedliche PCR-Produkte enthalten. M: DNA-Marker. 1-8: DNA selektierter Klone.

Die nach dem Kontrollverdau sichtbaren Längenunterschiede der Fragmente, die ursprünglich eine annähernd gleiche Grösse besaßen, können durch interne Schnittstellen in den Fragmenten hervorgerufen sein oder durch Verunreinigungen bei DD RT-PCR und Reamplifikation. Da jeder der Klone das für die unterschiedliche Bandenintensität verantwortliche DNA-Fragment enthalten kann, wurden für die weitere Arbeit alle Klone mit Ausnahme derer ausgewählt, deren Fragmente eine Grösse von weniger als 100 bp aufwiesen. Insgesamt standen dadurch 58 Klone für die nachfolgende Sequenzanalyse zur Verfügung.

Die in pGEM-T enthaltenen Fragmente wurden mit SP6- und T7-Primern sequenziert (ABI PRISM 310). Die Analyse der Fragmentsequenzen wurde nach Abtrennung der Vektor-Sequenzen mit HUSAR- sowie NCBI-Software, basierend auf dem BLAST (Basic local alignment search tool)-Algorithmus durchgeführt ([Altschul et al., 1990](#)):

1. Vergleich der Sequenzen eines Bandenansatzes (HUSAR)
2. Vergleich aller Sequenzen miteinander (HUSAR)
3. Vergleich der Sequenzen mit nichtredundanten Gen-Datenbanken (HUSAR/NCBI)
4. Vergleich der Sequenzen mit EST-Datenbanken (NCBI)

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse aus nichtredundanten Genbanken sowie der EST-Datenbank (NCBI, Stand 6/1997) sind in Tabelle 4 zusammengefasst, aufgeführt sind jeweils die Sequenzen mit maximaler Homologie (e-value).

**Tabelle 3** Auswertung der Sequenzierungen ausgewählter DD RT-PCR-Fragmente

<b>Klon</b>	<b>Accession-Nummer</b>	<b>NCBI blastn Resultate</b>
0103HD	AC004016	Homo sapiens BAC clone RG424N05
0104HD	SU63963	Human CSF-1 receptor (FMS) gene and (SMF)gene
0108HD	AA801087	EST 190584, rat
0201HD	AA801087	EST 190584, rat
0205HD	U15177	Human cosmid CRI-JC2015
0206HD	AA711905	EST vu28h09.r1
0306HD	AA315456	EST 187298
0404HD	L42085	Homo sapiens subclone 9_e1 from P1 H16
0405HD	HSU93305	Homo sapiens A4 differentiation-dependent protein DNA
0408HD	HSU93305	Homo sapiens A4 differentiation-dependent protein DNA
0503HD	U51240	Human lysosomal-associated multitransmembrane Protein
0504HD		unbekannt
0607HD	AC000385	Human Chromosome 11 pac pDJ392a17
0706HD	AC005218	Homo sapiens chromosome 5, P1 clone 737H5
0802HD		unbekannt
0806HD	X03205	Human 18S ribosomal RNA
0902HD	Z99570	Homosapiens DNA sequence from PAC 119E23
0906HD		unbekannt
1006HD		unbekannt
1007HD	AB001895	Homo sapiens mRNA for B120
1104HD	X03205	Human 18S ribosomal RNA
1201HD	X93334	Homo sapiens mitochondrial DNA
1402HD	X59357	Human mRNA for EBV sRNAs (EBERs)associated protein
1603HD	X93334	Homo sapiens mitochondrial DNA
1608HD	M17987	Human beta-2-microglobulin gene, exon 2 and 3
1802HD		unbekannt
1803HD		unbekannt
1804HD		unbekannt
1805HD	AB001895	Homo sapiens mRNA for B120
1808HD	AB001895	Homo sapiens mRNA for B120
2002HD	M17987	Human beta-2-microglobulin gene, exon 2 and 3
2102HD	AC005288	Homo sapiens chromosome 17, clone hCIT.131
2201HD		unbekannt
2202HD		unbekannt
2204HD	M17987	Human beta-2-microglobulin gene, exon 2 and 3

2305HD	AB001895	Homo sapiens mRNA for B120
2307HD	AB001895	Homo sapiens mRNA for B120
2402HD	AC004197	Homo sapiens clone UWGC:y28c204
2403HD		unbekannt
2404HD	Z96698	Homo sapiens telomeric DNA sequence, clone 7PTEL064
2504HD		unbekannt
2505HD	M11167	Human 28S ribosomal RNA gene
2508HD	AC003043	Homo sapiens chromosome 17, clone HRPC1067M6
2602HD	U94747	Human WD repeat protein HAN mRNA
2802HD		unbekannt
2804HD		unbekannt
3001HD		unbekannt
3002HD	K03432	Human 18S ribosomal RNA
3008HD		unbekannt
3102HD	U17474	Human autoantigen mRNA
3103HD		unbekannt
3301HD		unbekannt
3302HD		unbekannt
3405HD	AF042384	Homo sapiens BC-2 protein mRNA
3701HD	Z92844	Human DNA sequence from PAC 435C23
3704HD	AF052578	H. sapiens androgen receptor associated protein 24
3801HD		unbekannt
3802HD		unbekannt

Die Homologien der untersuchten 58 Sequenzen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Spezifische humane Gensequenzen:	17	(29%)
Sequenzen von EST's:	4	(7%)
Humane chromosomale DNA-Sequenzen:	11	(19%)
Ribosomale (4), mitochondriale (2) RNA-Sequenzen	6	(10%)
Sequenzen ohne Homologien:	20	(35%)

Die anschliessend durchgeführte Auswahl der zu untersuchenden Sequenzen wurde aufgrund folgender Kriterien getroffen:

- Zu Beginn sollten Sequenzen mit Homologien zu bekannten Genen untersucht werden sowie EST-homologe Sequenzen, da deren Expression anzunehmen ist.
- Als zweite Gruppe sollten die Sequenzen ohne bekannte Homologien untersucht werden sowie die mitochondrialen Sequenzen. Letztere vor allem aufgrund der während des apoptotischen Prozesses ablaufenden mitochondrialen Veränderungen wie Cytochrom-c-Freisetzung und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.
- Nicht berücksichtigt wurden chromosomale Sequenzen und ribosomale RNasequenzen, da diese in der DD RT-PCR häufig eine Quelle falsch-positiver Ergebnisse darstellen.

### **3.1.3 Northern Blot Hybridisierungen**

Zur Bestätigung der Ergebnisse der DD-RT-PCR wurden auf der Basis der klonierten Fragmente nach Amplifikation radioaktiv markierte DNA-Sonden hergestellt und mit Northern Blots hybridisiert. Zur Herstellung der Northern Blots wurde RNA aus BL60-2 Zellen isoliert, die mit anti-IgM inkubiert wurden ( 4, 8, 12, 24 Stunden) bzw. nicht mit anti-IgM inkubiert wurden (bezeichnet als 0-Stunden-Wert). Für die zu Beginn untersuchten Fragmente

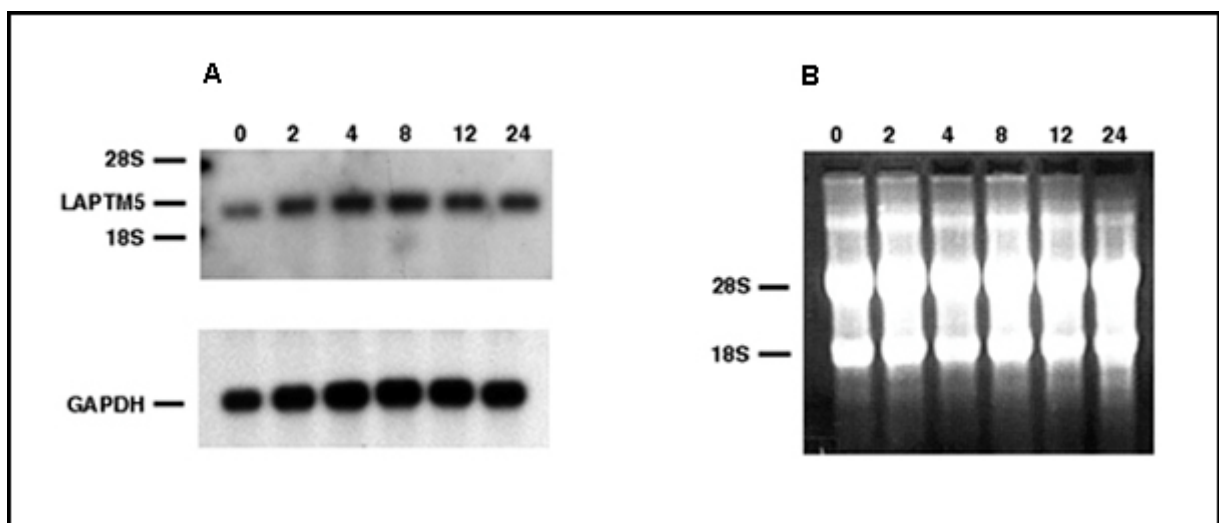
- 0104HD (Humanes CSF-1-Rezeptor-Gen)
- 0108HD (EST 190584)
- 0206HD (EST vu.28h09.r1)
- 0306HD (EST 187298)
- 0405HD (Humanes differenzierungsabhängiges Protein A4)

konnte die differentielle Expression nicht bestätigt werden. Entweder hybridisierten die Sonden gleich stark oder gar nicht. Die beobachtete hohe Anzahl falsch positiver Befunde ist ein generelles Problem der DD RT-PCR-Technik, in der Literatur liegen die Angaben dazu zwischen 10% und 70%.



Die Northern-Hybridisierung mit Fragment 0503HD (Lysosomal-assoziiertes Membranprotein mit 5 Transmembran-Domänen, LPTM5) bestätigte dessen differentielle Expression. Die verwendete Probe codiert für ein 350 bp-Fragment im 3'-Bereich der LPTM5-cDNA. Als Kontrolle wurde mit einer GAPDH-Sonde gegenhybridisiert. GAPDH, als Enzym des Intermediär-Stoffwechsels ubiquitär in nahezu allen Zellen exprimiert, bleibt in seiner Expression konstant über einen weiten Bereich, in dem die Zelle inneren und äusseren Reizen (Temperaturänderungen, Serumentzug) ausgesetzt ist. Wegen seiner Funktion wird GAPDH, neben anderen Genen, als „housekeeping gene“ bezeichnet und eignet sich gut als Kontrolle für die Qualität des Northern Blots.

Die Hybridisierung der LPTM5-Sonde mit BL60-RNA (Abb. 9) zeigt 2 Stunden nach Induktion von Apoptose einen Anstieg auf das 4-fache gegenüber der Wert der nicht-induzierten Vergleichspopulation (0 Stunden). Der zeitliche und qualitative Verlauf des Expressionsanstiegs konnte durch eine weitere Hybridisierung bestätigt werden. Der für diese Kontrollhybridisierung verwandte Northern Blot wurde aus RNA hergestellt, die nicht mit der für die Ersthybridisierung eingesetzten RNA identisch war.

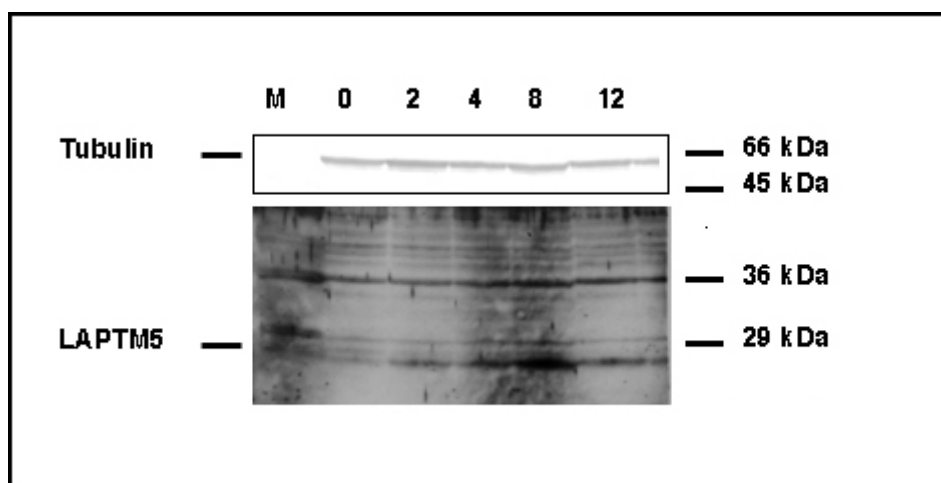


**Abbildung 9** Differentielle Hybridisierung von LPTM5. A) Northern-Hybridisierung mit dem Fragment 0503HD (LPTM5), sowie Gegenhybridisierung des Blots mit einer GAPDH-Sonde. Die Expression von LPTM5 steigt nach 2 Stunden an. B) zeigt die im Agarose-Gel aufgetrennte RNA (nach Färbung mit Ethidium-Bromid), die für den Northern Blot benutzt wurde.

Aufgrund der Hinweise auf eine Funktion von LPTM5 im Rahmen der Embryogenese sowie der Differenzierung hämatopoetischer Zellen wurde das Protein für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die verbliebenen DD RT-PCR-Fragmente wurden nicht weiter berücksichtigt.

### 3.1.4 Western Blot von LAPTM5

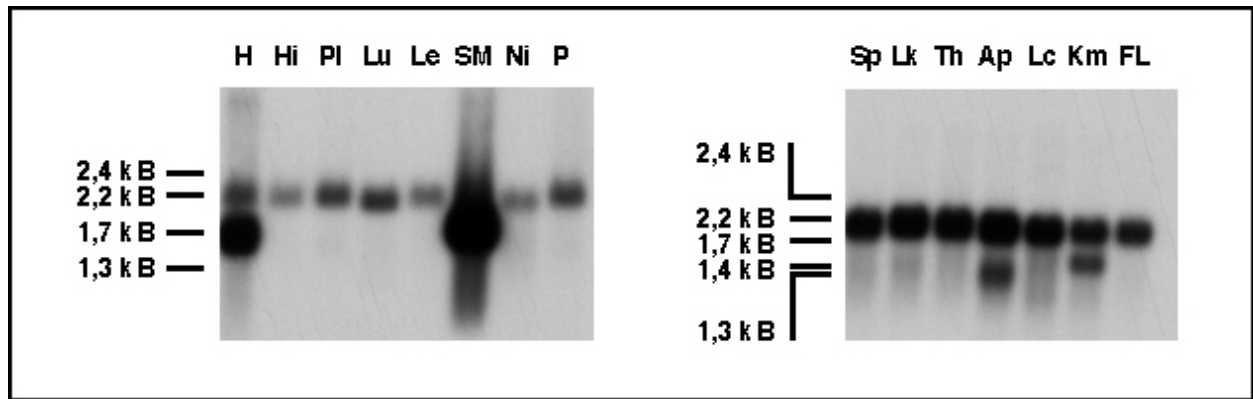
Um die differentielle Expression von LAPTM5 auf Proteinebene zu überprüfen, wurde Protein aus Zellen ohne Inkubation und nach Inkubation mit anti-IgM extrahiert. Zur Detektion wurde ein anti-LAPTM5-Antikörper benutzt, der gegen den C-terminalen Anteil des Proteins gerichtet ist (Peptidsequenz: **CSKTPEGGPAPPYSEV**, Dr. B. Lim, Boston). Als Kontrolle wurde der Blot mit einem anti-Tubulin-Antikörper inkubiert. Die Tubulin-Expression bleibt im beobachteten Zeitraum während der anti-IgM-induzierten Apoptose unverändert. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, liegt die LAPTM5-Bande bei ca. 27 kDa. Zwei Stunden nach Inkubation mit anti-IgM kommt es zum Anstieg der LAPTM5-Proteinmenge, die anschliessend nicht weiter zunimmt. Die verstärkte Expression der LAPTM5-mRNA korreliert mit der Zunahme der Proteinexpression nach ca. 2 Stunden. Die Hybridisierung mit anti-Tubulin-Antikörper zeigt eine gleichmässig starke Expression von Tubulin im untersuchten Zeitraum.



**Abbildung 10** Western Blot-Analyse LAPTM5. Proteinextrakt aus BL60-2-Zellen ohne Inkubation (0) und nach Inkubation mit anti-IgM (2,4,8,12 Stunden). Die Expression nimmt 2 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM deutlich zu.

### 3.1.5 Expressionsmuster von LAPTM5

Gene können in Abhängigkeit von der Funktion der Genprodukte in unterschiedlichen Differenzierungsstadien einer Zelle, in definierten Zellarten oder als Antwort auf verschiedenste Reize unterschiedlich stark exprimiert werden. Um die Expression von LAPTM5 in verschiedenen Geweben zu überprüfen, wurde auf Basis des in pGEM-T klonierten DD RT-PCR-Fragments eine radioaktive RNA-Sonde hergestellt (Riboprobe System, Promega). Diese wurde mit Northern Blots inkubiert, deren RNA aus mehreren humanen Geweben stammt (Multiple Tissue Northern, Clontech).



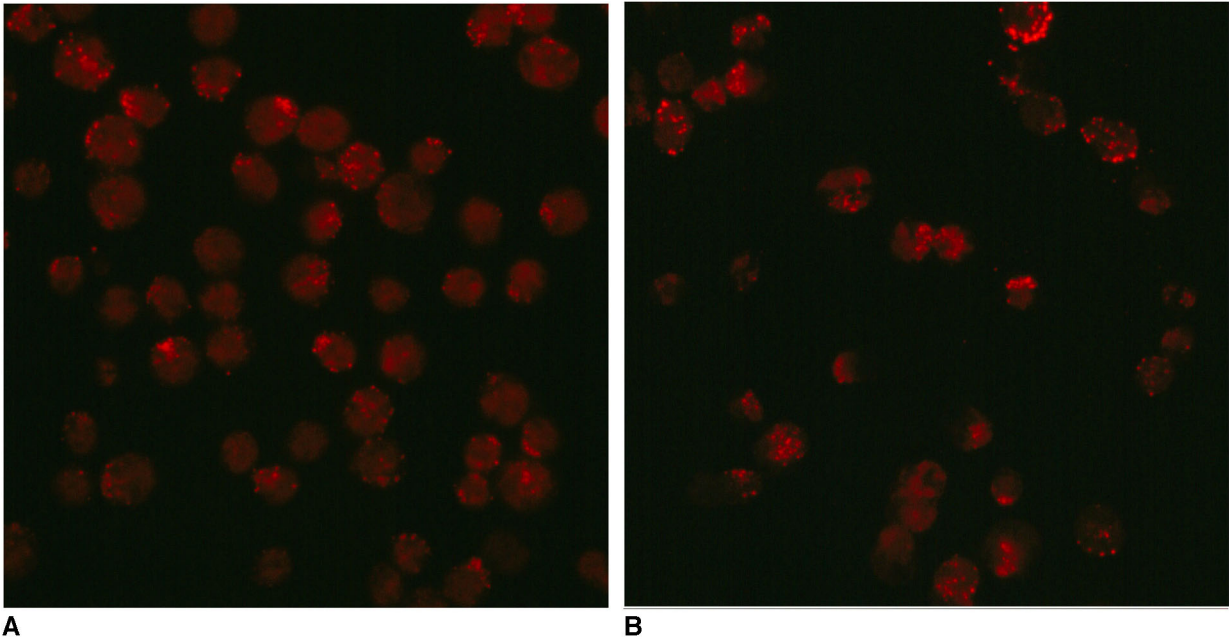
**Abbildung 11** Expressionsmuster von LPTM5. Multiple Tissue Northern (2µg poly-A<sup>+</sup>-RNA), Blot humanes Gewebe (links) und Blot humanes Immunsystem (rechts). Hybridisiert wurden beide Blots mit einer LPTM5-RNA-Sonde (Riboprobe) in einem Hybridisierungsansatz. Human: H=Herz, Hi=Hirngewebe, Pl=Placenta, Lu=Lunge, Le=Leber, SM=Skelettmuskulatur, Ni=Niere, P=Pankreas, Immunsystem: Sp=Milz, Lk=Lymphknoten, Th=Thymus, Ap=Appendix, L=Periphere Blut-Lymphozyten, Km=Knochenmark, FL=Fetale Leber.

LPTM5 wird vorwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems bzw. Immunsystems sowie in quergestreifter Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur exprimiert (Abb. 11). In geringen Mengen ist das Transkript jedoch auch in allen anderen untersuchten Geweben zu finden. Weiterhin wird deutlich, dass die Sonde mit mRNA unterschiedlicher Länge hybridisiert. Aufgrund der geringen Auftrennung der RNA konnte die Länge der detektierten RNA nur grob geschätzt werden. Die bei vollständiger Transkription zu erwartende Hybridisierung bei ca. 2,2 kbp fand sich in allen Geweben, möglicherweise mit Ausnahme des nicht sicher beurteilbaren Skelettmuskelgewebes. In Herzgewebe, Appendix sowie Knochenmark liegen jeweils zwei mRNA-Transkripte unterschiedlicher Länge vor. Zu beachten ist auch die stärkere Hybridisierung mit mRNA fetaler Leber im Vergleich zu mRNA adulter Leber.

### 3.1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie LPTM5

LPTM5 wurde nach Kolokalisationsstudien unter Verwendung der lysosomalen Membranproteine LAMP1, LAMP2 und CD63 in Lysosomen der humanen Erythroleukämie-Zelllinie HEL lokalisiert ([Adra et al., 1996](#)). Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation und der Verteilung von LPTM5 wurden BL60-2-Zellen sowie als Kontrolle HEL-Zellen mit anti-LPTM5 sowie Cy3-markiertem Zweitantikörper immunzytochemisch gefärbt und anschliessend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. LPTM5 ist sowohl in BL60-2 Zellen als auch in HEL-Zellen detektierbar. Es liegt ein nahezu gleichmäßiges Verteilungsmuster von punktförmigen Fluoreszenzmarkierungen vor. Mehrere Bereiche pro Zelle weisen jedoch eine erhöhte Dichte dieser Fluoreszenz-

markierungen auf und können als Konzentration des Proteins im Bereich der Lysosomen bzw. assoziierter Kompartimente angesehen werden (siehe Elektronenmikroskopie LAPTM5). Eine teilweise membranständige Fluoreszenz in beiden Zelllinien weist auf eine Lokalisation des Proteins in der Zellmembran hin. Um die Veränderung der Expression von LAPTM5 und eine mögliche intrazelluläre Umverteilung während des programmierten Zelltodes zu untersuchen, wurden BL60-2-Zellen angefärbt, die zuvor mit anti-IgM inkubiert wurden (Abb. 12). Im zeitlichen Verlauf (ohne Inkubation; 16 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM) konnte insgesamt keine ausgeprägte Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Die oben erwähnten Bereiche mit einer erhöhten Dichte der punktförmigen Fluoreszenzen zeigen eine stärkere Intensität nach Apoptose-Induktion als Hinweis auf eine Zunahme der Konzentration des Proteins im lysosomalen Kompartiment nach Induktion.

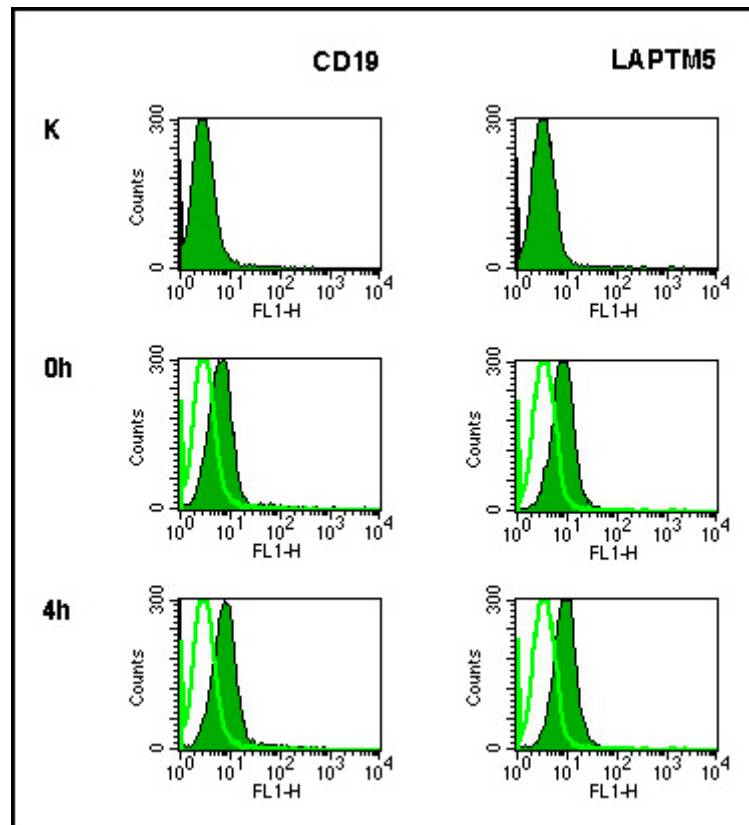


**Abbildung 12** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. BL60-2-Zellen nach Inkubation mit anti-LAPTM5 sowie anti-Rabbit-Cy3. A: Intakte Zellen mit punktförmigem Fluoreszenzmuster und Bereichen mit erhöhter Fluoreszenzdichte. B: Zellen 16 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM. Leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Inkubation der Zellen mit anti-IgM in Bereichen, die auch ohne Inkubation eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen.

### 3.1.7 FACS-Analyse von LAPTM5

Um die Lokalisation von LAPTM5 in der Plasmamembran zu bestätigen, wurde die Expression des Proteins auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Als Kontrolle wurde die Expression des Oberflächen-Antigens CD19 bestimmt, das in B-Zellen aller Differenzierungsstadien mit Ausnahme von Plasmazellen produziert wird und ein B-Zell-Marker ist (Abb. 13). Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Oberflächen-Expression von LPTM5 (und CD19) im Verlauf der IgM-vermittelten Apoptose.

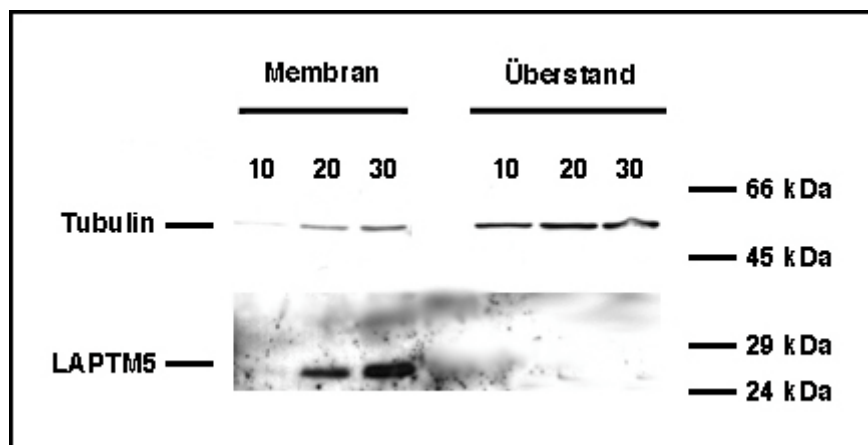


**Abbildung 13** FACS-Analyse von LPTM5. BL60-2-Zellen ohne Inkubation mit anti-IgM (0h) oder 4 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM (4h) wurden mit anti-CD19-FITC (Becton Dickinson) oder anti-LPTM5 (Rabbit) und Zweitantikörper (anti-Rabbit-FITC) inkubiert. K: Kontrolle: FACS-Analyse ohne Antikörper (CD19), nur Zweitantikörper anti-Rabbit-FITC (LPTM5). LPTM5 und CD19 können auf der Oberfläche von BL60-2-Zellen detektiert werden. Die LPTM5-Expression bleibt im untersuchten Zeitraum (4 Stunden) konstant. der Expression von LPTM5 in BL60-Zellen.

Es zeigte sich, dass LPTM5 auf der Zelloberfläche detektiert werden kann und somit als Transmembranprotein auch innerhalb der Plasmamembran lokalisiert ist. Entsprechend der Bindungsdomäne des verwendeten Antikörpers ist es wahrscheinlich, dass der C-terminale Anteil von LPTM5 auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran liegt. Da keine weiteren LPTM5-Antikörper zur Verfügung stehen, ist die Detektion von LPTM5-Varianten bzw. von strukturell ähnlichen Proteinen mit gleichem Epitop durch den eingesetzten Antikörper nicht auszuschliessen. Die Expressionsdichte innerhalb der Plasmamembran ist relativ niedrig und verändert sich nach Inkubation mit anti-IgM nicht. Eine Zunahme der Expression von LPTM5 in der Plasmamembran ist also während des programmierten Zelltodes nicht vorhanden.

### 3.1.8 Membranständige Lokalisation von LPTM5

Zur Kontrolle der Lokalisation von LPTM5 in Membranen von B-Zellen wurde die Expression des Proteins in membranhaltigen Zellbestandteilen untersucht. Dazu wurden die Zellen solubilisiert und durch Zentrifugation Membrankompartimente von Cytosol getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Gel aufgetrennt und geblottet. Nach Inkubation des Blottes mit anti-LPTM5 konnte das Protein nur in der membranhaltigen Fraktion detektiert werden (Abb. 14).  $\alpha$ -Tubulin, das als Kontrollprotein untersucht wurde, ist ein vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes, teilweise auch membranassoziertes Strukturprotein, dass sich auch in BL60-Zellen vor allem in der cytosolischen Fraktion nachweisen lässt.



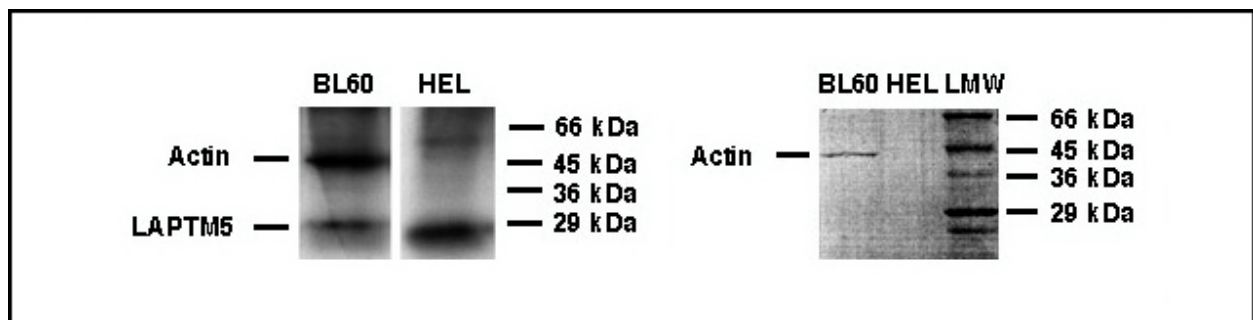
**Abbildung 14** Membranständige Lokalisation von LPTM5. Auftrennung von BL60-2-Lysaten mit unterschiedlicher Proteinmenge (in  $\mu$ g) nach Fraktionierung in Membranbestandteile und Überstand. Inkubation mit anti-LPTM5-AK und anti-Tubulin-AK. LPTM5 liegt nur in der Membranfraktion vor, Tubulin vorwiegend im Überstand, wie der Vergleich beider Fraktionen zeigt.

### 3.1.9 Protein-labeling und Immunpräzipitation von LPTM5

Nach [ $^{35}$ S]-*in vitro*-labeling wurden die Lysate von BL60-Zellen und HEL-Zellen mit anti-LPTM5-AK inkubiert und anschliessend aufgetrennt. Die Immunpräzipitation wurde zur Suche nach LPTM5-assoziierten Proteinen bzw. LPTM5-Varianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht eingesetzt. Hinweise auf mögliche LPTM5-Varianten lieferte insbesondere die Northern-Analyse, die in einigen Geweben RNA-Banden unterschiedlicher Grösse zeigte. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt in BL-60-Zellen ca. 27 kDa, assoziierte Proteine wurden unter den angewandten Bedingungen nicht gefunden. Die Übereinstimmung der detektierten Bande mit dem LPTM5-Protein wurde durch anschliessende Western-Analyse der Präzipitate bestätigt.



Ein nur in BL-60-Zellen, nicht jedoch in Kontrollzellen (HEL) detektiertes Protein wurde als beta-Aktin identifiziert, das unspezifisch an Agarose A bindet. Die Bestimmung als beta-Aktin erfolgte aufgrund des Molekulargewichtes (42kDa) sowie durch massenspektrometrische Analyse (MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) und SWISSPROT-Datenbankrecherche (Volker Badock, MDC Berlin). Mögliche Ursache für die fehlende Detektion von beta-Aktin in HEL-Zellen ist eine geringe Expression oder die Expression eines LPTM5-Variante, die nicht an Agarose bindet.



**Abbildung 15** Immunpräzipitation von LPTM5. Links: [ $^{35}$ S]-haltige Lysate (BL60-2, Kontrolle: HEL) wurden mit anti-LPTM5-gekoppelter Agarose A inkubiert, die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Das LPTM5-Protein ist ca. 27 kDa gross. Die zweite Bande der BL60-2-Linie bei ca.45 kDa wurde als beta-Aktin identifiziert. Rechts: Inkubation von nichtmarkierten Lysaten (BL60-2, HEL) mit Agarose A, Auftrennung und Färbung des Blottes nach Coomassie. Die detektierte Bande bei ca. 45 kDa entspricht beta-Aktin, das unspezifisch an Agarose A bindet.

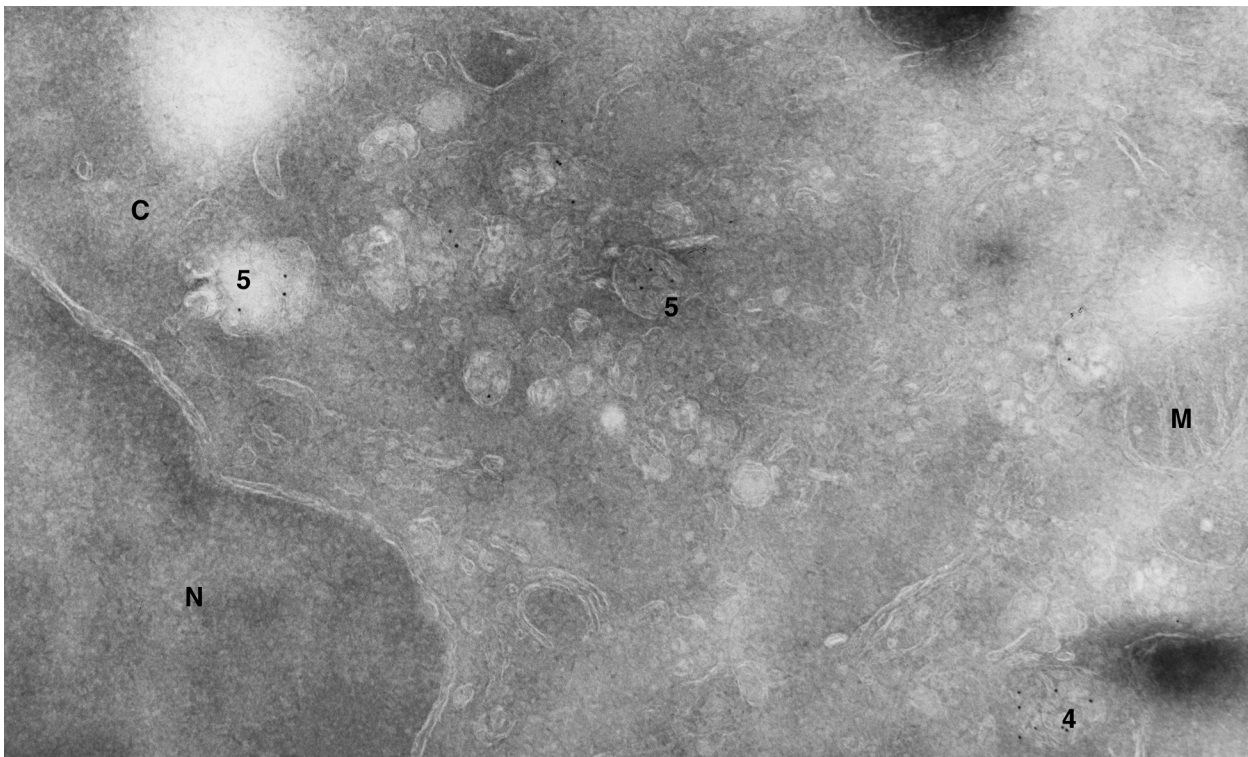
### 3.1.10 Elektronenmikroskopische Lokalisation von LPTM5

Die subzelluläre Lokalisation von LPTM5 wurde bisher in Koloalisationsexperimenten mit lysosomal-assoziierten Proteinen sowie durch Western-Analyse von Zellfraktionen untersucht. Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation von LPTM5 innerhalb endosomal-lysosomaler Kompartimente sowie zur Untersuchung der vermuteten Lokalisation in der Plasmamembran wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Immunogold-Staining-Verfahren, Dr. Vogel, MDC). Diese zeigten wie erwartet die intrazelluläre Lokalisation im endosomal-lysosomalen Kompartiment sowie vereinzelt die Assoziation mit der Plasmamembran. Durch Kleijmeer et. al. wurden endocytotische Kompartimente in B-Zellen in 6 Subtypen eingeteilt ([Kleijmeer et al., 1997](#)). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick.

**Tabelle 4** Einteilung endosomaler und lysosomaler Kompartimente in B-Zellen.

Subtyp	Beschreibung	Marker
1	Frühe Endosomen (early endosomes, EE)	Transferrin-Rezeptor
2	Frühe Endosomen (early endosomes, EE)	Transferrin-Rezeptor
3	Späte Endosomen (late endosomes, LE)	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
4	Späte Endosomen (late endosomes, LE)	Lysosomal-assoziierte Proteine
5	Lysosomen, multivesikulär und laminär	Lysosomal-assoziierte Proteine
6	Lysosomen, laminär	Lysosomal-assoziierte Proteine

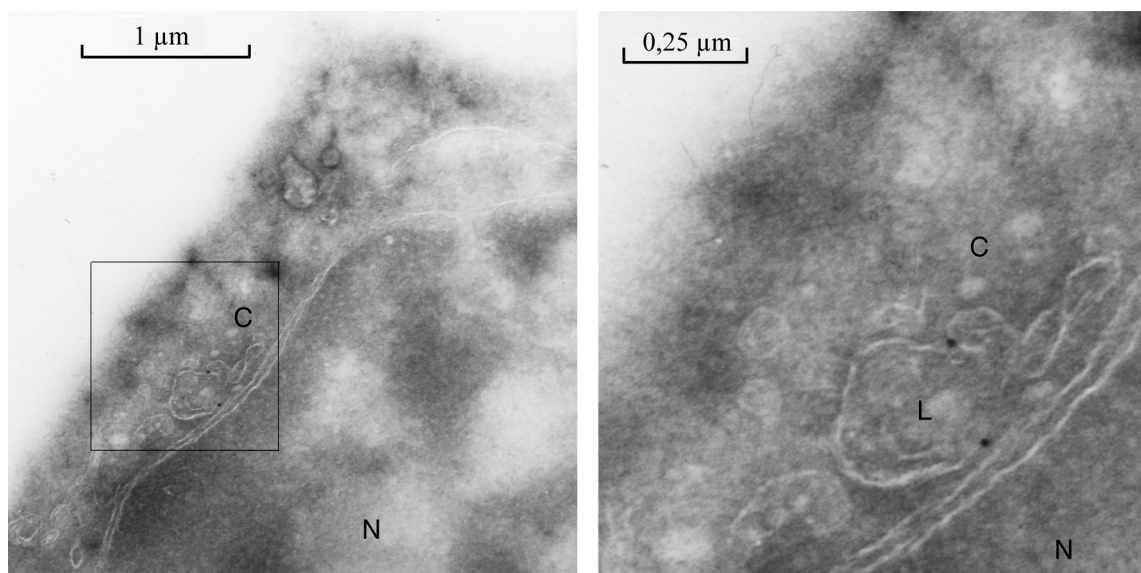
Entsprechend den morphologischen Kriterien liegt LAPTM5 vorwiegend innerhalb der Kompartiment-Typen 4 und 5 vor. Diese Subtypen enthalten weitere Vesikel und werden daher als multivesikulär bezeichnet. LAPTM5 ist, wie in Abbildung 16 zu sehen ist, innerhalb von späten Endosomen bzw. multivesikulären Lysosomen vorwiegend in der Membran und der Matrix der Endosomen / Lysosomen lokalisiert, eine Lokalisation innerhalb der intralysosomalen Vesikel wurde nicht festgestellt. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen der Western-Analyse, die für LAPTM5 eine ausschliessliche Lokalisation in der membranhaltigen Fraktion zeigte.



**Abbildung 16** Elektronenmikroskopische Lokalisation von LAPTM5 in BL60-2-Zellen (Immunogold staining). LAPTM5 befindet sich vorwiegend in späten Endosomen (Typ 4) und multivesikulären Lysosomen. N=Nukleus, C=Zytoplasma, M=Mitochondrien, 4=Typ-4-Kompartiment (multivesikuläre, späte Endosomen), 5=Typ-5-Kompartiment (multivesikuläre Lysosomen).



Ebenfalls untersucht wurde die Lokalisation von LAPTM5 in BL60-2-Zellen nach Inkubation mit anti-IgM (16 Stunden). Da es sich um Einzelzell-Untersuchungen handelt und die Zellen nach morphologischen Kriterien ausgewählt wurden (Chromatinkondensation, Fragmentierung zytolasmatischer Bestandteile), kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, in welchem Stadium des programmierten Zelltodes sich die Zellen befinden. Aus diesem Grund keine quantitative Auswertung der LAPTM5-Expression durchgeführt. In den untersuchten Lymphozyten sind die Endosomen und Lysosomen auch nach Beginn apoptotischer Prozesse morphologisch intakt, teilweise sind sie verkleinert und eher länglich. Sie liegen gemeinsam mit anderen Organellen im verschmälerten Zytoplasmasaum um den Zellkern herum. LAPTM5 ist auch innerhalb der lysosomalen Membran apoptotischer Zellen vorhanden, wie Abbildung 17 zeigt. Eine Veränderung der Expression oder subzellulären Lokalisation des Proteins war nach Induktion in den untersuchten Zellen nicht sichtbar.



**Abbildung 17** Elektronenmikroskopische Lokalisation von LAPTM5 in BL60-2-Zellen nach Inkubation mit anti-IgM. N=Nukleus, C=Zytoplasma, L=Lysosomen.

Abschliessend erfolgt eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels:

LAPTM5 wird als lysosomal-assoziiertes Protein während der anti-IgM-induzierten Apoptose unreifer B-Zellen verstärkt exprimiert. Eine erhöhte Expression von LAPTM5 erfolgt nach 2 Stunden auf RNA- und Protein-Ebene und bleibt anschliessend nahezu konstant.

Für LAPTM5 wurde neben der lysosomalen auch eine Lokalisation in der Plasmamembran nachgewiesen. Während der B-Zell-Apoptose bleibt die Expression von LAPTM5 in der Plasmamembran konstant.

Neben der vorwiegenden Expression in hämatopoetischen Geweben findet sich eine hohe Konzentration von LAPTM5-RNA in Herz- und Skelettmuskel-Gewebe. In Abhängigkeit von der jeweiligen Zellart liegen unterschiedliche RNA-Transkripte vor.

LAPTM5 wurde kloniert und es wurde nachgewiesen, dass auf Grundlage der LAPTM5-cDNA *in vitro* ein funktionelles Protein synthetisiert wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Damit steht eine LAPTM5-cDNA zur Verfügung, die zusammen mit dem im folgenden Kapitel beschriebenen Expressionssystem zur weiteren Charakterisierung von LAPTM5 eingesetzt werden kann.

### 3.2 Episomale Genexpression in BL60-2-Zellen

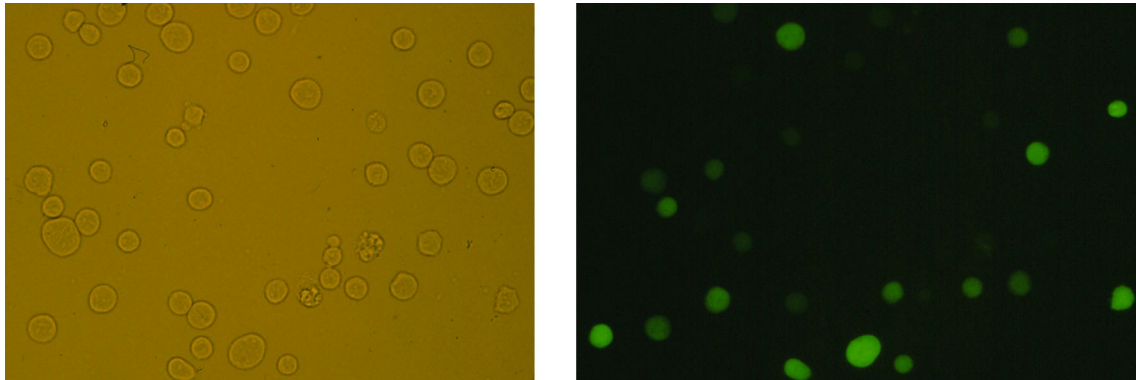
Die funktionelle Charakterisierung von Proteinen kann durch die Expression transfizierter Gene erfolgen. Für den Gentransfer stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die in virale und nicht-virale Transfermethoden eingeteilt werden. Zur letzten Gruppe gehören z.B. Liposomaler Transfer, Rezeptor-vermittelter Transfer, die direkte Injektion von DNA in die Zielzelle oder die Elektroporation von Zellen. Dabei können die Empfängerzellen die transfizierten Gene kurzzeitig produzieren (transiente Expression) oder, nach Integration der codierenden DNA in das Genom, dauerhaft exprimieren (stabile Expression). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Vektoren, die nicht in das Genom integrieren, jedoch durch autonome Replikation eine über mehrere Wochen anhaltende Expression ermöglichen (episomale Stabilität / metastabile Expression).

Für die Untersuchung von Genen in BL60-2-Zellen sollte ein Expressionssystem angewandt werden, das die Herstellung einer grossen Anzahl von Transfektanten innerhalb kurzer Zeit (3 Tage) ermöglicht. Um eine Zellpopulation mit hohem Anteil an transfizierten Zellen herstellen zu können, muss entweder eine Methode mit hoher Transfektions-Effizienz eingesetzt werden oder die transfizierten Zellen müssen selektioniert werden. Diese Selektion kann zum Beispiel über Antibiotika-Resistenz-Marker, über magnetische Separation oder durch Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) erfolgen. Voraussetzung für eine effiziente Anwendung dieser Verfahren ist die intrazelluläre Stabilität der transfizierten Plasmid-DNA, verbunden mit einer hohen, konstanten Expressionsrate. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte der Gentransfer durch Elektroporation sowie eine nachfolgende Selektion unter Verwendung eines episomal-stabilen Vektorsystems (pREP-Vektoren, Invitrogen) erfolgen.

#### 3.2.1 EGFP-Expression als Reportersystem und Elektroporation von B-Zellen

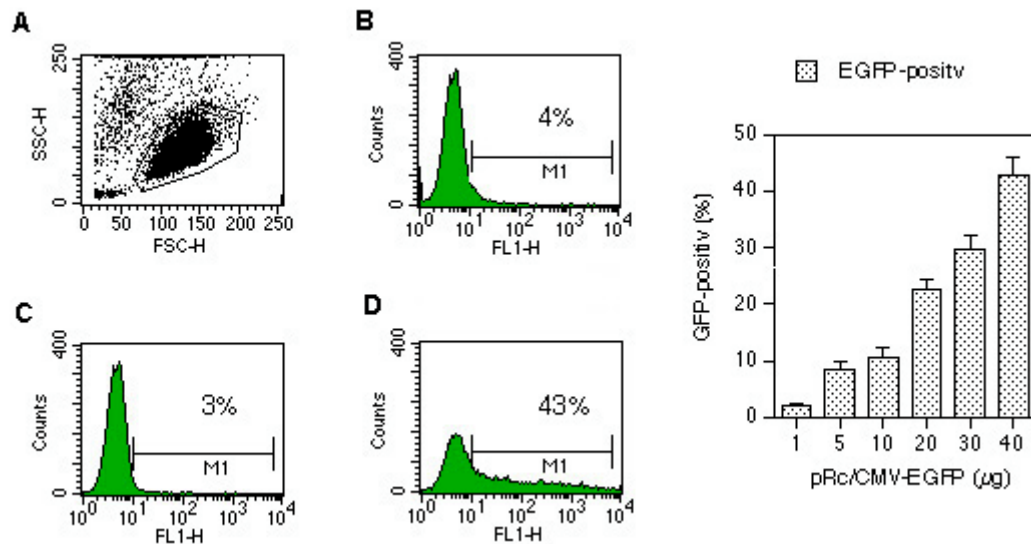
Zur Etablierung eines Transferverfahrens ist die reproduzierbare Quantifizierung der Transfektionsrate nötig. Als Reportersystem wurde die Expression von EGFP (enhanced green fluorescent protein) in den transfizierten Zellen benutzt, die sich fluoreszenzmikroskopisch oder durch FACS-Analyse messen lässt. Die EGFP-cDNA stellt eine modifizierte Form des GFP-Proteins dar, die für die Expression in Humanzellen optimierte Codons besitzt sowie nach Anregung eine verstärkte Fluoreszenz aufweist. Zunächst wurde die Expression von EGFP in BL60-2-Zellen

durch Transfektion des Plasmids pRc/CMV-EGFP (V. Pevzner, MDC Berlin) mittels Elektroporation nach Standardprotokoll getestet. Wie Abbildung 18 zeigt, wird EGFP in den B-Lymphozyten exprimiert.



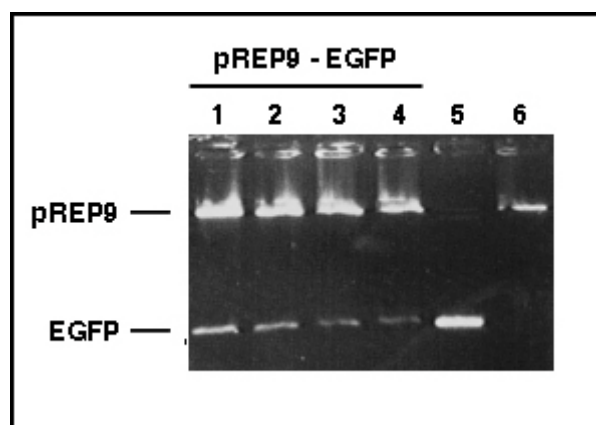
**Abbildung 18** Expression von pRc/CMV-EGFP in BL-60-2-Zellen. Fluoreszenzmikroskopie. Links: Hellfeld-Aufnahme. Rechts: Dunkelfeld-Aufnahme. EGFP-produzierende Zellen emittieren grünes Licht.

Zum Transfer von Plasmid-DNA in BL60-2-Lymphozyten wurden die Zellen in DNA-haltigem Medium elektroporiert. Zur Optimierung der in der Literatur für B-Lymphozyten zitierten Transfektionsbedingungen für die eingesetzten BL-60-Zellen wurden unterschiedliche Parameter variiert (Temperatur, Zellzahl, DNA-Konzentration oder Medium). Die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch nach Färbung mit Trypanblau gemessen, die Transfektionsrate durch FACS-Analyse quantifiziert. Vor allem die Änderung der eingesetzten Plasmid-Menge führte zu einer Zunahme der Transfektionseffizienz. Neben der Transfektionsrate erhöhte sich dabei jedoch auch der Anteil toter Zellen, so dass die absolute Anzahl transfizierter Zellen nach einem Maximum wieder abfällt. Aus diesem Grund wurden die geschädigten Zellen bzw. Zelltrümmer 24 Stunden nach der Transfektion durch FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation abgetrennt. Der Anteil vitaler, EGFP-produzierender Zellen lag für das Plasmid pRc/CMV-EGFP nach Aufreinigung bei ca. 40%. Die Abhängigkeit der Transfektionsrate von der eingesetzten DNA-Menge zeigt Abbildung 19.



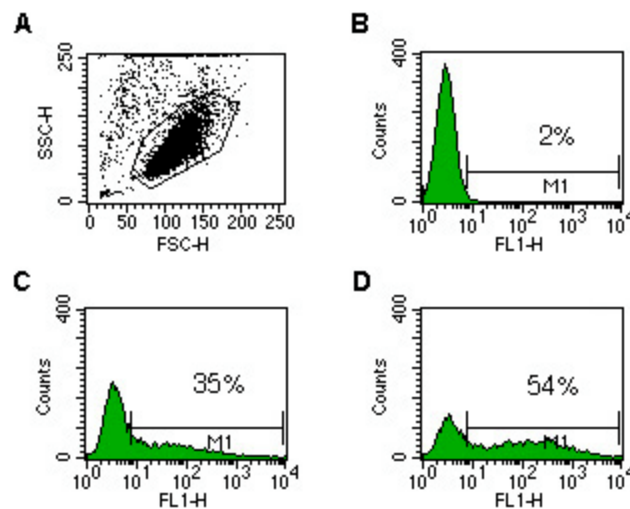
**Abbildung 19** Expression von EGFP in BL60-2-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pRc/CMV-EGFP mittels Elektroporation transfiziert und über FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Links: Die Messung der EGFP-Expression erfolgt durch FACS-Analyse. A) Untersuchte Zellpopulation. B) Kontrolle: Elektroporierte Zellen ohne DNA im Transfektionsansatz. C) pRc/CMV-EGFP, 1μg. D) pRc/CMV-EGFP, 40μg. Rechts: Abhängigkeit der Transfektionsrate von der eingesetzten Plasmid-Menge.

Nach der Transfektion wurden die aufgereinigten Zellen weiter kultiviert und auf Vitalität und Wachstum sowie auf die Expression von EGFP untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen und keine erhöhte Zahl toter Zellen. Der Anteil EGFP-produzierender Zellen nahm innerhalb von 3 Tagen von 40% auf weniger als 5% ab und war eine Woche nach Transfektion nicht mehr zu bestimmen. Die Verwendung des Vektors pRc/CMV zeigte in Verbindung mit der Transfektion durch Elektroporation und der anschließenden Aufreinigung eine ausreichende hohe Expression in BL60-Zellen. Da die Dauer der Expression nicht anhielt, wurde ein Vektor-Konstrukt hergestellt, das aus dem episomal-stabilen Vektor pREP9 und EGFP-cDNA (aus pRc/CMV-EGFP) besteht (Abb. 20).



**Abbildung 20** pREP9-EGFP-Konstrukt. Kontrollrestriktion. 1-4: pREP9-EGFP, 5 EGFP-Insert, 6 pREP9

Das pREP9-EGFP-Konstrukt wurde in unterschiedlicher Konzentration in BL60-2 Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Kultivierung und anschliessender Ficoll-Aufreinigung wurde die Expression von EGFP gemessen. Auch mit diesem Vektor konnte in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-Menge eine hohe Expressionsrate (maximal um 50%) bei unveränderter Wachstumsgeschwindigkeit und Vitalität erreicht werden (Abbildung 21). Die Expression von EGFP blieb über 14 Tage annähernd konstant und nahm danach leicht ab.



**Abbildung 21** Expression von pREP9-EGFP in BL60-2-Zellen. A) Untersuchte Zellpopulation. B) Kontrolle: 10 µg pREP9 ohne Insert. C) 10 µg pREP9-EGFP. D) 60 µg pREP9-EGFP.

Ausgehend von diesen Experimenten wurde das im Abschnitt „Methoden“ aufgeführte Elektroporationsprotokoll für weitere Transfektionen von BL60-2-Zellen mit Vektorkonstrukten auf der Basis des Vektors pREP9 eingesetzt.

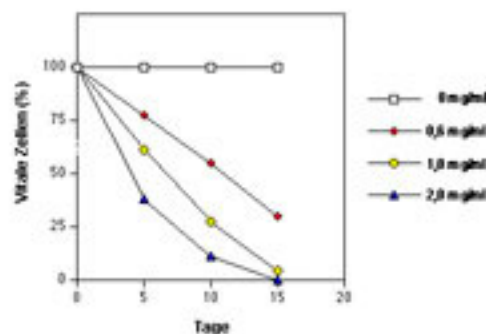
### 3.2.2 Aufreinigung transfizierter Zellen

Eine weitere Erhöhung des Anteils transfizierter B-Zellen ist durch Selektion der Transfektanten zu erreichen. Die Identifikation transfizierter Zellen kann prinzipiell über die Expression von Protein-Markern erfolgen, die im transfizierten Plasmid oder in einem zweiten, cotransfizierten Plasmid kodiert sind (Antibiotika-Resistenz-Proteine, Enzyme, Oberflächenmarker, Fluoreszenz-Proteine). Teilweise können die Proteine auch für die Selektion der Transfektanten benutzt werden. Zur Anreicherung von pREP9-transfizierten B-Zellen sollten folgende Methoden auf ihre Effizienz überprüft werden:

- Selektion über Resistenzmarker (G418, codiert in pREP9)
- Magnetische Separation über den Oberflächenmarker  $\Delta$ CD4
- Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

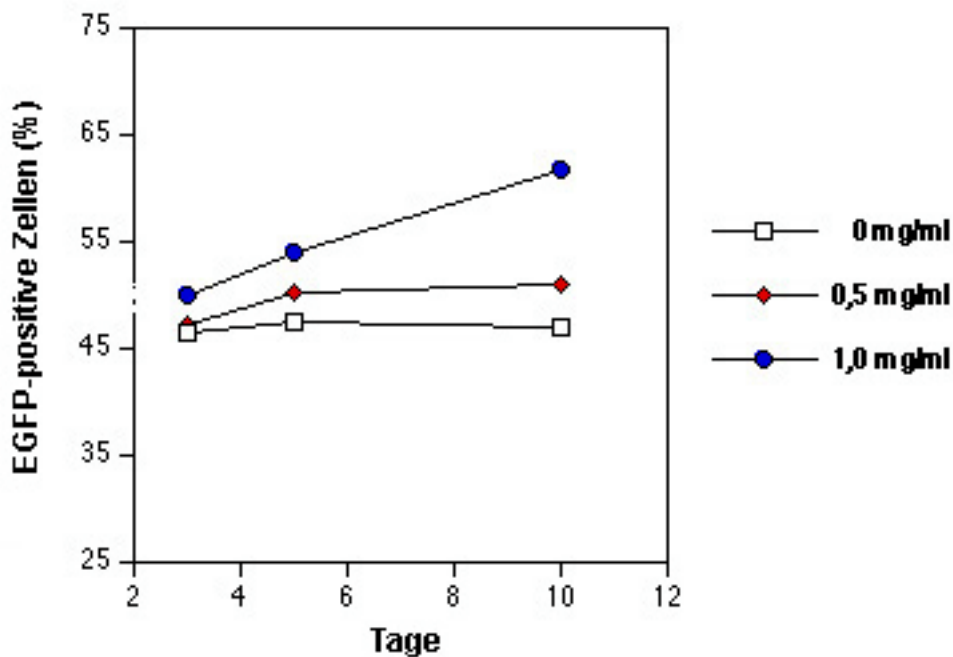
### 3.2.2.1 Selektion über Resistenzmarker:

G418-Sulfat (Neomycin/Geneticin-Analogon) ist ein Aminoglykosid, das mit der 80S-Untereinheit eukaryotischer Zellen interagiert und dadurch die Proteinsynthese hemmt. Für eine Resistenz gegenüber G418 codiert das Gen *tn5*, das im Vektor pREP9 vorhanden ist. Zunächst wurde die G418-Empfindlichkeit der BL60-2-Linie getestet und G418 dem Kulturmedium bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml zugesetzt (Abbildung 22). Die Zellen wurden jeweils nach 3 Tagen umgesetzt, mit G418-haltigem Medium versorgt und im gleichen Ausmass verdünnt. Wurden die Zellen mit G418 in einer Konzentration > 1mg/ml kultiviert, dann fand sich nach 15 Tagen eine relative Reduktion der Zellzahl um 95% im Vergleich zur Kontrollpopulation (ohne G418).



**Abbildung 22** G418-Sensitivität von BL60-2-Zellen. Angegeben sind die Zellzahlen von Populationen mit G418-Zusatz im Vergleich mit der Kontrollpopulation ohne G418 im Medium.

Als Selektionskonzentration wurde in der Folge 1mg G418/ml eingesetzt, da eine komplette Selektion durch eine höhere Konzentration nicht wesentlich früher einsetzt und eine hohe Konzentration auch das Wachstum resistenter Zellen vermindert. BL60-2-Zellen wurden wie beschrieben mit pREP9-EGFP transfiziert und in G418-haltigem Medium kultiviert. 10 Tage nach der Transfektion stieg der Anteil EGFP-produzierender Zellen von ca. 50% auf 60% (Abb. 23). Der weitere Selektionsverlauf wurde nicht ausgewertet, da mit dem Expressionssystem vor allem apoptotische Prozesse untersucht werden sollen und diese in B-Zellen nach maximal 48 Stunden beendet sind.



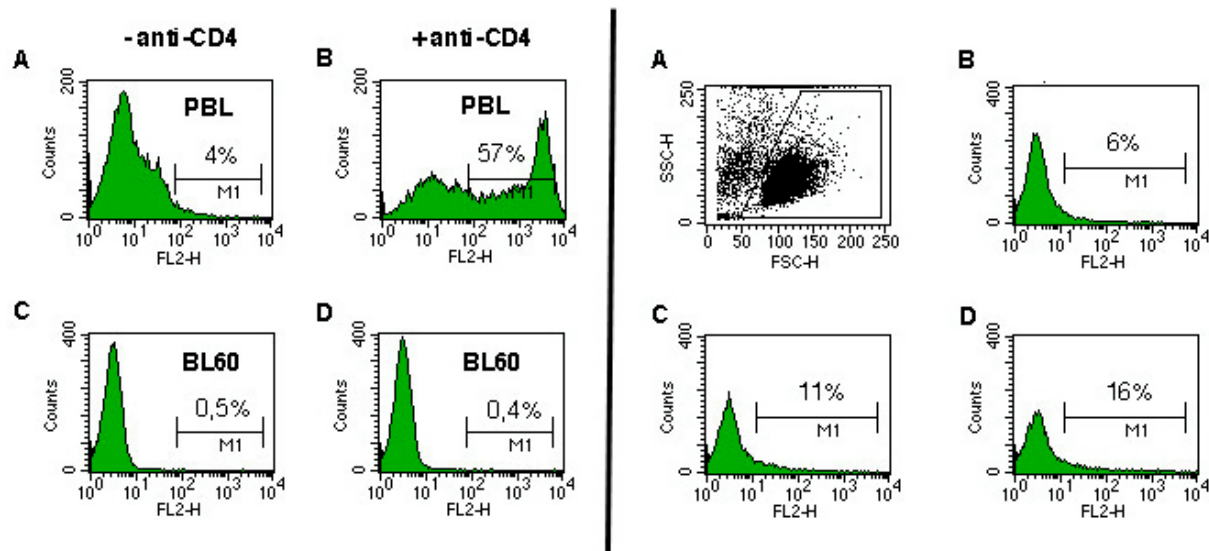
**Abbildung 23** G418-Selektion von BL60-2-Zellen nach Transfektion mit pREP9-EGFP. FACS-Analyse der EGFP-Expression nach 3, 5 und 10 Tagen. Bei einem Selektionsdruck von 1 mg G418/ml kommt es zu einer Erhöhung des Anteils EGFP-positiver Zellen, ohne Selektionsdruck bleibt dieser Anteil konstant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch G418-Inkubation transfizierte Zellen selektioniert werden können, eine Anwendung bei den zu untersuchenden Prozessen jedoch aufgrund der Selektionsdauer nicht sinnvoll ist.

### 3.2.2.2 Magnetische Separation über das Oberflächenantigen $\Delta$ CD4

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Transfektanten ist die Selektion über spezifisch in den transfizierten Zellen exprimierte Oberflächenantigene. CD4 ist ein Molekül, das an der Oberfläche von T-Helfer-Zellen exprimiert wird und für die Interaktion mit MHCII-exprimierenden Zellen und die anschließende Transduktion eines Interaktionssignals in das Innere der T-Zelle verantwortlich ist. Da CD4 nicht in B-Zellen exprimiert wird, kann es nach Transfektion in B-Zellen als Selektionsmarker benutzt werden. Eine trunkierte Form des CD4-Moleküls ( $\Delta$ CD4) ohne zytoplasmatischen, signaltransduzierenden Anteil ist in dem Vektor pMACS4 (Miltenyi Biotec) kodiert.  $\Delta$ CD4-exprimierende Transfektanten können über magnetische Aufreinigung von nicht-transfizierten Zellen abgetrennt werden. Nach Transfektion von pMACS4 in BL60-2-Zellen wurde das  $\Delta$ CD4-Protein auf der Zelloberfläche exprimiert, wie durch FACS-Analyse unter Verwendung von anti-CD4-AK nachgewiesen werden konnte (Abbildung 24).

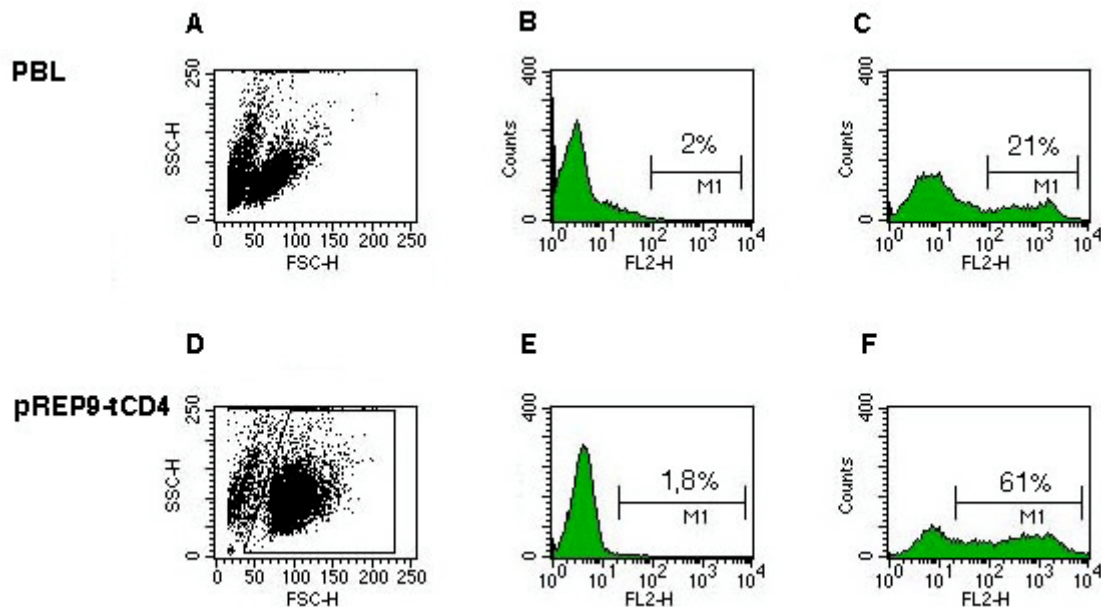




**Abbildung 24** Links: CD4-Expression in Lymphozyten: A, B: Positiv-Kontrolle: Periphere Blut-Lymphozyten (PBL). C, D: Negativ-Kontrolle: BL60-2-Zellen. Rechts: Expression von  $\Delta$ CD4 in BL60-2-Zellen nach Transfektion des pMACS4-Vektors. FACS-Analyse. A: untersuchte Zellpopulation. B, C,D: BL60-2-Zellen transfiziert mit pMACS4-DNA (10, 20, 30  $\mu$ g Plasmid-DNA).

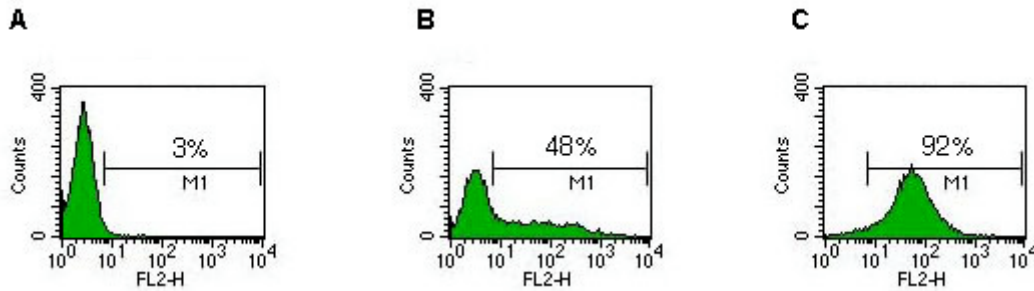
Insgesamt ist die Transfektionseffizienz bzw. Expression von pMACS4-kodiertem  $\Delta$ CD4 in den BL60-Zellen geringer als die Expression von EGFP nach Transfektion von pREP9-EGFP. Bei gleicher DNA-Menge hätte, zumindestens theoretisch, aufgrund der geringeren Plasmidgrösse eine höhere Expression von  $\Delta$ CD4 im Vergleich zu EGFP erfolgen müssen, ein genauer Vergleich ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Vektoren und Proteine nicht möglich.

Um die Expression des trunktierten CD4-Moleküls zu erhöhen, wurde die  $\Delta$ CD4-cDNA in den Vektor pREP9 kloniert und das Plasmid wie beschrieben in B-Zellen transfiziert. Anschliessend wurde die Expression des  $\Delta$ CD4-Proteins durch FACS-Analyse gemessen. Auch auf Basis des transfizierten pREP9- $\Delta$ CD-Konstrukts synthetisierten die Zellen das  $\Delta$ CD4-Molekül (Abb. 25).



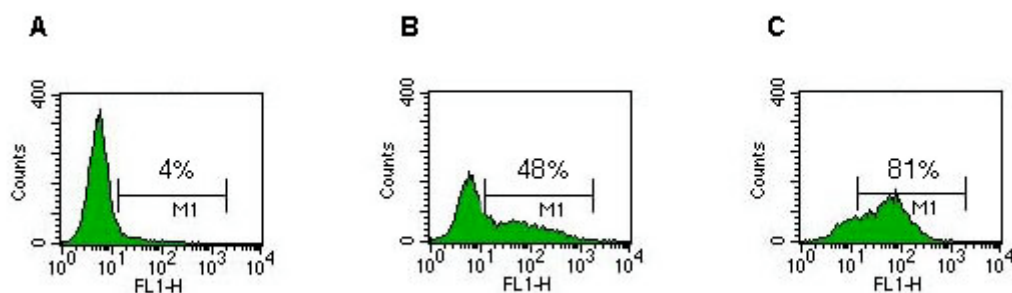
**Abbildung 25** Expression von  $\Delta$ CD4 in BL60-2-Zellen nach Transfektion des Vektors pREP9- $\Delta$ CD4. Oben: Periphere Blutlymphozyten. A: Zellpopulation. B: ohne Inkubation mit anti-CD4. C: nach Inkubation mit anti-CD4. Unten: BL60-2-Zellen. D: Transfizierte Zellpopulation. E: Transfizierte Zellen ohne Inkubation mit anti-CD4. F: Transfizierte BL60-2-Zellen nach Inkubation mit anti-CD4.

Zunächst wurde zur Selektion der  $\Delta$ CD4-exprimierenden Zellen das MACSelect-System benutzt. Hierbei werden mit anti-CD4-Antikörpern gekoppelte Partikel mit den  $\Delta$ CD4-exprimierenden Zellen inkubiert und die entstehenden Konjugate von den restlichen Zellen abgetrennt. Die Zellen wurden jedoch während der Aufreinigungsprozedur stark geschädigt, so dass die Ausbeute intakter,  $\Delta$ CD4-positiver Zellen nach der Selektion gering blieb. Da dies auch nach Abänderung des Protokolls (Einsatz modifizierter Puffer, Abtrennung der magnetischen Partikel nach der Aufreinigung) nicht verbessert werden konnte, wurde dieses System verlassen. Als Alternative wurde das ebenfalls auf Metallpartikeln basierende DYNAL-System eingesetzt, bei dem keinerlei Effekte auf Wachstum und Vitalität beobachtet wurden. Das DYNAL-System bietet zudem den Vorteil, dass nach der Selektion die Konjugate durch Inkubation mit einem weiteren Antikörper wieder aufgetrennt werden können. Dadurch stehen die aufgereinigten Zellen für eine sofortige FACS-Analyse zur Verfügung. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis einer Selektionsrunde.



**Abbildung 26** DYNAL-Aufreinigung pREP9- $\Delta$ CD4-transfizierter Zellen. FACS-Analyse der  $\Delta$ CD4-Expression nach Inkubation mit anti-CD4-AK. A: pREP9-Transfektanten. B: pREP9- $\Delta$ CD4 Transfektanten vor der Aufreinigung. C: pREP9- $\Delta$ CD4-Transfektanten nach Aufreinigung.

Im Durchschnitt liegt der Anteil  $\Delta$ CD4-positiver, vitaler Zellen 24 Stunden nach DYNAL-Selektion bei 90%. Eine Erhöhung durch weitere Selektionsrunden ist denkbar, wurde aber wiederum aufgrund des damit verbundenen erhöhten Zeitaufwandes für die gesamte Selektion nicht weiter verfolgt. Unter optimalen Bedingungen ist bei der Cotransfektion von zwei Plasmiden die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle beide Plasmide erhält, sehr hoch. Um den Anteil der Zellen zu ermitteln, die ein zu untersuchendes zweites Protein nach Selektion exprimieren, wurden BL60-Zellen mit pREP9-EGFP und pREP9- $\Delta$ CD4 cotransfiziert. Nach magnetischer Aufreinigung der  $\Delta$ CD4-positiven Transfektanten wurde die Expression von EGFP in diesen Zellen gemessen. Dabei lag der Anteil EGFP-produzierender Transfektanten zwischen 80 und 85% (Abbildung 27).



**Abbildung 27** Expression von EGFP in BL60-2-Zellen nach Cotransfektion von pREP9-EGFP und pREP9- $\Delta$ CD4. FACS-Analyse der EGFP-Expression. A: Kontrolle: Cotransfizierte Zellen (pREP9- $\Delta$ CD4, pREP9). B: Cotransfizierte Zellen (pREP9- $\Delta$ CD4, pREP9-GFP) vor Selektion. C: Cotransfizierte Zellen (pREP9- $\Delta$ CD4, pREP9-GFP) nach Selektion,  $\Delta$ CD4-positive Fraktion.

Durch die magnetische Aufreinigung lässt sich also der Anteil von Zellen mit dem letztlich interessierenden, kotransfizierten Protein von 45% (vor der Selektion) auf ca. 80% steigern.

Damit steht ein Expressions-und Selektionssystem für BL60-Zellen mit folgenden Eigenschaften zur Verfügung:

- Expression des Zielproteins in ca. 80% der Zellen
- Dauer der Expression über mindestens 10 Tage nahezu konstant
- kein Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und Vitalität der Zellen im beobachteten Zeitraum.

## 4 Diskussion

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Untersuchung der anti-IgM-induzierten Apoptose in B-Zellen und die Identifikation differentiell exprimierter Gene. Durch Anwendung der Differential Display RT-PCR erfolgte der Nachweis von Genen, die in anti-IgM-stimulierten und nichtstimulierten Zellen unterschiedlich stark exprimiert werden. Die differentielle Expression dieser Gene in B-Zellen wurde durch nachfolgende Northern-Blot-Analysen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass das LAPTM5-Gen im Verlauf der B-Zell-Apoptose verstärkt exprimiert wird. Anschliessend wurde LAPTM5 hinsichtlich seiner subzellulären Lokalisation in BL-60-Zellen sowie der Expression in humanen Geweben untersucht.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit war die Etablierung eines System für die episomal-stabile Expression von Genen in B-Zellen. Unter Verwendung des Vektors pREP9 sowie durch magnetische Aufreinigung von transfizierten Zellen über das Oberflächen-Antigen  $\Delta$ CD4 wurde ein effizientes Expressions- und Selektionssystem entwickelt. Es erlaubt eine über 10 Tage anhaltende, gleichmässig hohe Expression von Genen sowie die Selektion einer Zellpopulation, die zu ca. 80% das transfizierte Gen produziert. Die hohe Transfektionseffizienz sowie das Selektionsverfahren ermöglichen die Anreicherung von Zellen innerhalb kurzer Zeit und ohne die potentiell zytotoxische Anwendung von Antibiotika. Die Ergebnisse dieser Experimente sowie die unterschiedlichen Methoden, die zur Identifikation differentiell exprimierter Gene und zur Gen-Expression in B-Zellen eingesetzt werden können, werden im folgenden diskutiert.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung der physiologischen Form des Zelltodes für den Gesamtorganismus verstärkt erkannt und die Untersuchung dieses ubiquitären, evolutionär konservierten Prozesses intensiviert. Neben verschiedenen Induktoren von Apoptose konnten mehrere Transduktionswege für apoptotische Signal charakterisiert werden. Dazu zählen das FAS-Ligand/FAS-Rezeptor-System, das mit diesem verwandte TNF/TNF-Rezeptor-System sowie, spezifisch für B-Zellen, der IgM-Komplex. Im Vergleich mit anderen Apoptose-induzierenden Systemen lagen für die IgM-vermittelte Apoptose relativ wenig Daten vor, so dass ein umfassendes Verständnis dieses komplexen Prozesses fehlte. Eine wesentliche Frage war, inwieweit eine *de novo* Synthese von Proteinen erfolgt und ob diese Proteine für die Ausführung des apoptotischen Programmes notwendig sind oder ob die Neusynthese eine unspezifische Reaktion auf einen biologischen Stress darstellt. Aufgrund der Bedeutung

der B-Zell-Apoptose im Rahmen der Entwicklung und Homöostase eines funktionellen Immunsystems sowie der Folgen einer Fehlregulation, die Grundlage lymphoproliferativer oder Autoimmunerkrankungen sein können, ist die genaue Kenntnis apoptotischer Prozesse notwendig. Die Identifizierung involvierter Gene bzw. Proteine kann einen wesentlichen Beitrag dazu liefern und Ausgangspunkt für die Entwicklung von geeigneten Therapiekonzepten sein.

#### 4.1 Identifizierung Apoptose-assoziiierter Gene in BL60-Zellen

Zur Identifikation von Genen, deren Expression während der IgM-vermittelten Apoptose von B-Zellen verändert ist, wurde ein Subklon der Burkitt-Lymphom-Linie BL60 benutzt (BL60-2). BL60-2 Zellen zeigen nach 24-stündiger Inkubation mit anti-IgM zu 50% - 70% einen apoptotischen Phänotyp (fragmentierte Kerne, Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche).

Der Vergleich der Genexpression apoptischer Zellen und nichtapoptotischer Zellen erfolgte durch die Differential-Display-RT-PCR-Technik: RNA beider Populationen wurde in cDNA transkribiert und mit spezifischen Primer-Paaren amplifiziert. Nach Auftrennung der PCR-Produkte zeigt die Intensität der Banden korrespondierender Primerpaare die konstante bzw. differentielle Expression des entsprechenden Genes an. 38 PCR-Amplifikate wurde als eindeutig differentiell eingestuft und mit den entsprechenden Primer-Paaren reamplifiziert. Da die Amplifikate bei gleicher Länge unterschiedliche Sequenzen besitzen können und jedes dieser Fragmente für das differentielle Bandenmuster verantwortlich sein kann, wurden diese kloniert und verdaut. Pro Amplifikationsansatz lagen nach Kontrollverdau 1-5 Fragmentmuster vor. Anhand von Sequenzanalysen der klonierten Fragmente wurde eine Auswahl für die notwendige Bestätigung der differentiellen Expression mit Northern-Blot-Analyse getroffen. Es erfolgte die Bildung von Fragment-Gruppen mit Hilfe der bisherigen Kenntnisse über die jeweilige Sequenz, um die Northern-Blot-Verfahren möglichst effektiv einsetzen zu können.

Bei den untersuchten 58 Sequenzen handelt es sich um 17 bekannte Gensequenzen bei teilweiser Redundanz (29%), 4 EST-Sequenzen (7%), 11 chromosomale Sequenzen (19%), 6 mitochondriale oder ribosomale RNA-Sequenzen (10%) sowie um 20 Sequenzen ohne bekannte Homologien (35%). Primär wurden Sequenzen bekannter Gene sowie EST-Sequenzen weiter untersucht, weil bei diesen die

Expression des entsprechenden Proteins bereits gesichert ist.

Da die RT-PCR, u.a. aufgrund der exponentiellen Amplifikation der cDNA, eine grosse Anzahl falsch positiver Ergebnisse liefert, ist eine Bestätigung der differentiellen Expression nötig. Die Northern Analyse mit RNA aus apoptotischen und nichtapoptotischen Zellen konnte für die zu Beginn untersuchten Fragmente (Humanes CSF-1-Rezeptor-Gen, EST 190584, EST vu.28h09.r1, EST 187298 und Humanes differenzierungsabhängiges Protein A4) eine differentielle Expression in apoptotischen Zellen nicht bestätigen. Die Hybridisierung der entsprechenden Sonden erfolgte entweder konstant oder gar nicht. Mögliche Ursache für eine fehlende Hybridisierung ist die geringere Sensitivität der Northern-Hybridisierung im Gegensatz zur DD RT-PCR. Die Detektion von RNA-Sequenzen, die in geringer Zahl pro Zelle vorliegen und durch DD RT-PCR vervielfältigt werden können, gelingt mit Northern Analysen meist nicht. Eine Alternative hierzu ist die Verwendung von poly-A<sup>+</sup>-RNA für die Blots oder der Einsatz anderer Hybridisierungsmethoden (nuclear run on: Hybridisierung von geblotteter DNA mit poly-A-RNA der Vergleichspopulationen). Diese erfassen jedoch trotz höherer Sensitivität ebenfalls nicht alle Transkripte.

Die differentielle Expression des Klons 0503HD, dessen Sequenz im untersuchten Bereich eine nahezu vollständige Homologie (99%) zum Protein LAPTM5 aufwies, konnte bestätigt werden. Die Expression von LAPTM5 (lysosomal-associated protein, 5 transmembranes) in BL60-2 Zellen nimmt 2 Stunden nach Inkubation mit anti-IgM zu und bleibt anschliessend nahezu konstant. Auch auf Proteinebene erfolgt 2 Stunden nach Induktion von Apoptose eine verstärkte Expression von LAPTM5, wie die Western-Analysen mit einem gegen den C-Terminus des Proteins gerichteten Antikörper zeigten.

## 4.2 LAPTM5: Struktur und Expressionsmuster

### 4.2.1 Struktur des LAPTM5-Gens und potentielle Struktureigenschaften von LAPTM5

Das evolutionär konservierte LAPTM5-Gen wurde auf Chromosom 1 lokalisiert (1p34), eine Beteiligung dieses Genabschnitts an genetisch bedingten Erkrankungen ist nicht bekannt ([Adra et al.,1996](#)). Das RNA-Transkript besitzt eine Grösse von ca. 2,2 kbp und wurde in hämatopoetischem Gewebe sowie in geringen Mengen in Plazenta, Leber und Nieren nachgewiesen. Für das LAPTM5-Protein wurde ein Molekulargewicht von 29 kDa angegeben. Das LAPTM5-Transkript wurde in der entsprechenden Grösse (2,2 kbp) auch in den untersuchten BL60-2-Zellen gefunden. Daneben wurden weitere Transkripte geringer Grösse detektiert, insbesondere in Herz- und Skelettmuskelgewebe (1.3-1.7 kbp). Für lamp-2 und andere lysosomale Membranproteine wurden RNA-Splice-Varianten beschrieben, die gewebsspezifisch exprimiert werden und wahrscheinlich unterschiedliche biologische Funktionen besitzen ([Konecki et al.,1995](#); [Cuervo et al.,2000](#)). Unklar ist, ob dies auf die unterschiedlichen LAPTM5-Transkripte zutrifft.

Die Grösse des LAPTM5-Proteins lag in der Immunpräzipitation sowie in Western-Analysen jeweils bei 27 kDa. Ob die Differenz zur angegebenen Grösse auf unterschiedlichen Reaktionsbedingungen oder auf zellspezifischen Modifikationen des Proteins beruht, ist unklar.

Das LAPTM5-Gen (cDNA) hat eine Länge von 2232 Nukleotiden, die codierende Sequenz (786bp = 262 Aminosäuren) beginnt nach einem untranslatierten Bereich (76 Nukleotide) und wird in 3'-Richtung gefolgt von einer relativ grossen, nichttranslatierten Region (1371 Nukleotide). Potentielle strukturelle Eigenschaften sind 5 hydrophobe Bereiche, 6 Phosphorylierungsstellen sowie eine Prolin-reiche Region im C-terminalen Abschnitt. Für Proteine mit Prolin-reichen Regionen wurden Interaktionen mit SH3-haltigen Proteinen sowie eine Funktion als Ionenkanal beschrieben ([Ren et al.,1993](#); [Rotin et al.,1994](#)).



#### 4.2.2 Gewebespezifische Expression von LPTM5

Die gewebespezifische Expression von LPTM5 konnte im Northern Blot bestätigt werden. Neben der Expression in hämatopoetischen bzw. lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten, Thymus, Appendix, Knochenmark) zeigte sich eine besonders starke Expression in quergestreifter Muskulatur und Herzmuskulatur. Daneben wird LPTM5 auch in anderen Geweben exprimiert, jedoch in wesentlich geringeren Mengen. Die Diskrepanz zu den Vorarbeiten, in denen keine extralymphatische Expression festgestellt wurde, ist erklärbar durch die Verwendung einer RNA-Sonde, die im Gegensatz zu DNA-Sonden stärker mit RNA hybridisiert und damit sensitiver ist. Die Beobachtung höherer RNA-Level in fetaler Leber als in adulter Leber unterstützt die Annahme, dass LPTM5 während der Embryogenese in einer wesentlich grösseren Anzahl von Geweben exprimiert wird. Ein Hinweis auf eine Rolle während der Entwicklung von B-Zellen ist die Beobachtung, dass LPTM5 in unreifen B-Zellen (SP2-Linie) stärker exprimiert wird als in höher differenzierten B-Zellen (MPC-11-Linie) ([Adra et al., 1996](#)).

#### 4.2.3 Transkriptionelle Regulation von LPTM5

In einer Arbeit von Scott wurde gezeigt, dass die Expression von LPTM5 während der Differenzierung von myeloischen Zellen durch Retinolsäure (RA, über den intrazellulären Retinolsäure-Rezeptor RAR $\alpha$ ) beeinflusst wird ( [Scott et al., 1996](#), dort als E3 bezeichnet). LPTM5 kann im Kontext der Myelozyten-Differenzierung als immediate-early-Gen bezeichnet werden: 15 Minuten nach Inkubation von MPRO-Zellen mit RA steigt die Transkriptionsrate, besitzt nach ca. einer Stunde ein Maximum und bleibt über 4 Stunden konstant, um dann langsam abzufallen. Early response-Gene, deren Expression innerhalb von 30 Minuten nach Induktion ansteigt, codieren häufig für Transkriptionsfaktoren. Neben der Induktion von Transkriptionsfaktoren kann jedoch auch die transkriptionelle Regulation von Membranproteinen innerhalb kurzer Zeit erfolgen (gas-3 und mtf). Retinolsäure ist als Vitamin-A-Metabolit in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert. Dazu gehören Embryogenese, zelluläre Homöostase, Differenzierung von Geweben und Tumorsuppression. Die Vermittlung von RA-Effekten erfolgt über intrazelluläre Rezeptoren (RAR, RXR), die zur Familie der Steroid-Rezeptoren gehören und sich in ihrer Affinität zu verschiedenen Formen von Retinolsäure-Isomeren unterscheiden. Die Wirkung dieser Rezeptoren wird über spezifische DNA-

Sequenzen vermittelt (Retinoic Acid Receptor Response Elements, RARE), zu finden u.a. in Genen wie CRBP1/2 (Cellular retinol binding proteins) und Hoxa1/2 (Homöobox-Proteine).

Als RA-Rezeptor-bindende Elemente (RARE) wurden in der 5'-Region des LPTM5-Gens (Maus) zwei benachbarte Sequenzbereiche ca. 580 bp in 5'-Richtung ab ATG-Codon identifiziert. Die TATA-Box (Transkriptionsstart) liegt 210 bp upstream der ATG-Start-Sequenz. Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und regulative Elemente (E2A, TCF $\alpha$ , AP2, IRF1, IRF2, GATA, PEBP2, NF $\kappa$ B und SRF1) sind innerhalb von -1000bp vorhanden. Da die Induktion von Apoptose in BL60-Zellen über den IgM-Transduktionsweg erfolgte, ist eine Beteiligung von Retinolsäure bzw. RA-Rezeptor an diesem Prozess unwahrscheinlich. Eine erhöhte Expression von LPTM5 nach Inkubation von BL60-2 mit RA konnte für die eingesetzten RA-Konzentrationen nicht nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise sind jedoch die anderen Faktoren, für die potentielle Bindungsstellen im LPTM5-Promotor existieren, für die erhöhte LPTM5-Expression verantwortlich.

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wirkt bei verschiedenen apoptotischen Stimuli protektiv (TNF $\alpha$ , Wachstumsfaktorentzug, Chemotherapeutika), indem die verstärkte Expression antiapoptotischer Gene induziert wird. Für NF $\kappa$ B wurde bereits eine Rolle im Rahmen der IgM-induzierten Apoptose diskutiert ([Scott, 1995](#)). Hypothetisch ist eine NF $\kappa$ B-vermittelte Regulation von LPTM5. Ein nächster Schritt ist daher die Analyse der Promotorsequenz von LPTM5, z.B. in Reporterassays, oder die Expression von LPTM5 in NF $\kappa$ B-Transfektanten.

Während des programmierten Zelltodes in B-Zellen erfolgt eine veränderte Expression verschiedener Gene, u.a. des Transkriptionsfaktors c-myc. Der Einfluss von c-myc auf Zellzyklus und Apoptose ist abhängig von Zelltyp und Differenzierungsstadium. In BL60-Zellen wird die Expression von c-myc nach Inkubation mit anti-IgM stark reduziert (A. Rickers, Promotion). Die alleinige verminderte Expression scheint jedoch nicht ausreichend für die Auslösung von Apoptose zu sein ([McCormack et al., 1984](#)). Für die IgM-vermittelte Apoptose konnte jedoch gezeigt werden, dass neben der Modifikation und Interaktion vorhandener Proteine auch die Neusynthese von Proteinen notwendig ist: Die Inkubation von BL60-Zellen mit Cycloheximid hemmt die Ausbildung des apoptotischen Phänotyps nach Induktion mit anti-IgM.

Inwieweit die verstärkte Expression von LPTM5 im Rahmen der Apoptose essentiell

für den Ablauf dieses Prozesses ist oder ob es sich um eine unspezifische Reaktion auf den induzierten zellulären Stress handelt, ist unklar. Ein Ansatz zur Klärung dieser Frage ist die Überexpression von LAPTM5 in BL60-Zellen. Hierfür wurde ein LAPTM5-Konstrukt hergestellt sowie ein Expressionssystem etabliert. In weiteren Experimenten soll damit der Einfluss einer erhöhten LAPTM5-Konzentration auf B-Zellen und hier vor allem auf die Apoptose-Rate und die Proliferation der Zellen untersucht werden.

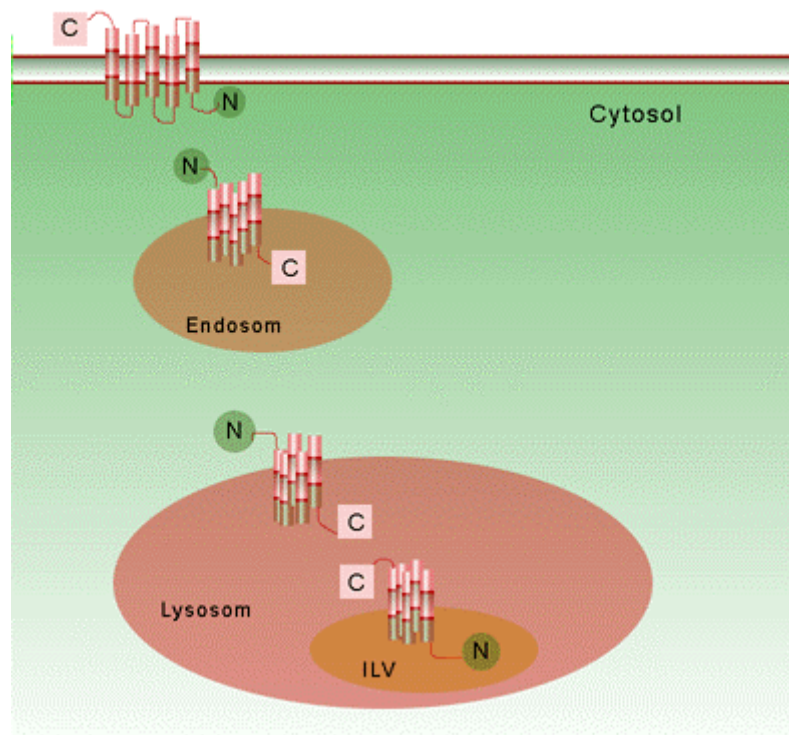
#### 4.3 LAPTM5 – Subzelluläre Lokalisation

Kolokalisationsanalysen sowie die Untersuchungen von subzellulären Fraktionen hatten ergeben, dass LAPTM5 mit Lysosomen assoziiert ist. Zusammen mit den aufgrund der hydrophoben Bereiche angenommenen 5 Transmembran-Domänen führte dies zur Namensgebung (Lysosomal associated protein, transmembrane-5).

Das LAPTM5-Protein wurde durch Immunfluoreszenz auch in BL60-Zellen nachgewiesen. Dabei zeigten sich punktförmige Bereiche erhöhter Fluoreszenzintensität, die zusammen mit den bekannten Daten sowie den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen als Konzentration des Proteins in Lysosomen bzw. endosomalen Kompartimenten zu werten sind. Nach Auslösung von Apoptose ist keine generelle Zunahme der Fluoreszenz und damit der LAPTM5-Expression zu beobachten. Ob die festgestellte Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Apoptose-Induktion in den lysosomalen Bereichen von biologischer Bedeutung ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Eine in der äusseren Zellmembran verstärkte Fluoreszenz liess auf eine Lokalisation des Proteins auch in der Plasmamembran schliessen. In daraufhin durchgeführten FACS-Analysen konnte diese Annahme bestätigt und eine Expression von LAPTM5 auf der Zelloberfläche gezeigt werden. Die Expressionsdichte von LAPTM5 in der Plasmamembran der BL60-Zellen ist gering und bleibt nach IgM-vermittelter Apoptose im untersuchten Zeitraum konstant. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei den vom Antikörper erkannten Strukturen der Zelloberfläche um LAPTM5 oder andere Moleküle mit vergleichbarem Epitop handelt. Der Nachweis von LAPTM5 gibt einen Hinweis auf die Orientierung zumindestens des C-Terminus des Proteins, gegen den der Antikörper gerichtet ist und der demzufolge extrazellulär liegt.

Zur weiteren Differenzierung der subzellulären Lokalisation von LAPTM5 wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von BL60-Zellen nach Immunogold-Färbung hergestellt (Dr. Vogel, MDC Berlin). LAPTM5 befindet sich im endosomal-lysosomalen Kompartiment sowie in geringen Mengen auch in der Zellmembran der B-Zellen. Die Systematik endozytotischer Kompartimente in B-Zellen nach Kleijmer unterscheidet 6 Subtypen (Kleijmer *et al.*, 1997; Tabelle 4). LAPTM5 liegt vorwiegend in multivesikulären, späten Endosomen (Typ 4) sowie in multivesikulären und laminären Lysosomen vor (Typ 5). Ausgehend von den Ergebnissen der FACS-Analyse und der Elektronenmikroskopie liegt der C-Terminus des Membranproteins in der Plasmamembran extrazellulär und in der lysosomalen Membran luminal (Abb. 28).



**Abbildung 28** Modell für die Orientierung des C-Terminus von LAPTM5. Das C-terminale Ende des Proteins ist in der Plasmamembran nach extrazellulär gerichtet. Nach Endocytose und Fusion der Endosomen mit primären Lysosomen liegt der C-Terminus luminal. In der Membran der intralysosomalen Vesikel (ILV) ist der C-Terminus zur lysosomalen Matrix hin orientiert.

Lysosomen sind reich an sauren Hydrolasen und verantwortlich für den Abbau von Makromolekülen. Diese können extrazellulären Ursprungs sein (Endozytose, Phagozytose) oder aus dem Zytoplasma stammen (Autophagie). Über die Funktion und Biochemie lysosomaler Membranproteine, die vor allem in späten Endosomen und in Lysosomen lokalisiert sind, ist relativ wenig bekannt. Sie werden aufgrund ihrer Proteinstruktur in 5 Familien unterteilt und ihr Molekulargewicht liegt zwischen 30 und

120 kDa. Die bekannten Proteine besitzen einen grossen intraluminalen Anteil, der stark glykosiliert ist.

Für lysosomale Membranproteine werden aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften sowie der Rolle der Lysosomen verschiedene Funktionen angenommen ([Hunziker and Geuze, 1996](#)):

- Schutz der lysosomalen Membran vor Degradation durch luminale Hydrolasen
- Transport von Aminosäuren und anderen Abbauprodukten aus den Lysosomen ([Zhang et al., 2000](#); [Davies et al., 2000](#); [Biederbick et al., 1999](#); [Alpy et al., 2000](#); [Town et al., 1998](#))
- Protonentransport zur Aufrechterhaltung des sauren pH sowie Transport anderer Ionen ([Verheijen et al., 1999](#))
- Regulation der Fusion mit anderen Organellen ([Tanaka et al., 2000](#)).

Durch Genmutationen bedingte Funktionsausfälle lysosomaler Membranproteine sind Ursache seltener, sehr heterogene Erkrankungen ([Mancini et al., 2000](#)).

LAPTM5 unterscheidet sich strukturell stark von den beschriebenen lysosomalen Membranproteinen und wurde bis jetzt noch nicht klassifiziert. Eine ausgeprägte Glykosylierung ist aufgrund der 5 Transmembran-Domänen sowie des geringen luminalen Anteils unwahrscheinlich. Die für die bekannten Proteine gefundenen lysosomalen Target –Sequenzen (Tyrosin-, Di-Leucin- und KCPL-Motif), notwendig für den Transport der Proteine zu den Lysosomen, sind nicht im C- oder N-terminalen Anteil von LAPTM5 vorhanden. Alternativ zu terminalen Target-Sequenzen können diese auch zwischen den Transmembran-Domänen lokalisiert sein ([Blagoveshenskaya et al., 1998](#)). Eine modifizierte Form des KCPL-Motifs ([Cherqui et al., 2001](#)) (KFPL) ist in einem der hydrophilen Bereiche von LAPTM5 vorhanden. Die Expression von LAPTM5 mit partiell veränderter Aminosäure-Sequenz könnte zur Identifikation des lysosomalen Target-Motifs beitragen.

Der Transport lysosomaler Membranproteine erfolgt über zwei unterschiedliche Transportwege. Beim sekretorischen Transport erfolgt nach Synthese im ER der Transport über das trans-Golgi-System zur Plasmamembran. Durch nachfolgende Endocytose und Fusion der frühen Endosomen gelangen die Membranproteine schliesslich zu späten Endosomen und Lysosomen. Für LAMP-1 wurde gezeigt, dass ein schneller Austausch zwischen Zellmembran- und endosomaler Fraktion existiert und ca. 4% der gesamten Proteinmenge konstant in der Zellmembran vorhanden ist

([Mathews et al.,1992](#)). Ein zweiter, direkter Weg verläuft über Clathrin-haltige Vesikel (Clathrin coated vesicals, CCV), die ebenfalls aus dem trans-Golgi-System stammen, jedoch direkt zu Lysosomen gelangen. Über diesen direkten Weg erfolgt der grössere Anteil des Transports lysosomaler Proteine.

LAPTM5 ist in geringem Ausmass ebenfalls auf der Oberfläche der untersuchten BL60-Zellen zu finden. Die nach Inkubation mit anti-IgM konstante Expression auf der Zelloberfläche ist möglicherweise auf einen direkten Transport der neusynthetisierten Proteine zu Lysosomen oder auf einen erhöhten Umsatz bei indirektem Transport via Plasmamembran zurückzuführen. Ob der Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran eine funktionelle Bedeutung zukommt, ist unklar. Beobachtet wurde eine erhöhte Expression lysosomaler Transmembran-Proteine auf stark metastasierenden Tumorzellen sowie vermehrte Adhäsion dieser Zellen. Auf Antigen-präsentierenden Zellen ist eine verstärkte Expression im Zusammenhang mit der Exocytose von MHCII-Peptid-Komplexen vorhanden ([Kannan et al.,1995](#); [Kannan et al.,1996](#)).

Es ergibt sich die Frage, ob dem lysosomen Kompartiment eine spezifische Funktion innerhalb des apoptotischen Programmes zukommt und worin diese bestehen kann. Freigesetzte lysosomale Enzyme können Apoptose auslösen, wahrscheinlich über die proteolytische Aktivierung von BID. Während des PCD bleiben Lysosomen jedoch intakt und behalten somit wahrscheinlich auch ihre Fähigkeit, Makromoleküle abzubauen. Einem weitestgehend unspezifischen Abbau von Proteinen in Lysosomen wird eine selektive, rezeptorvermittelte Aufnahme von Proteinen gegenübergestellt ([Cuervo et al.,1998](#)). Dass die selektive lysosomale Proteolyse eine physiologische Bedeutung für die Regulation cytosolischer Proteinkonzentrationen oder die Aktivität von Proteinen besitzt, konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ebenfalls diskutiert wurde eine Ubiquitin-vermittelte Aufnahme von Proteinen in Lysosomen, in die LAPTM5 involviert sein soll ([Adra et al.,1996](#)). Aufschluss über die Funktion lysosomaler Membranproteine während des PCD können letztlich nur weitere Untersuchungen liefern (z.B. Elektronenmikroskopie, Identifikation von Substraten/Liganden).

#### 4.4 Differential Display RT-PCR und alternative Methoden

Zur Identifikation von Genen, die in zu vergleichenden Zellpopulationen unterschiedlich stark exprimiert werden, stehen verschiedene molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Häufig angewandt werden differentielle und subtraktive Hybridisierung, Differential-Display-Techniken sowie cDNA- bzw. Oligonukleotid-Arrays. Eine Charakterisierung von Unterschieden zwischen Zellarten auf Proteinebene kann mit proteinchemischen Methoden, z.B. zweidimensionaler Gelelektrophorese, erfolgen. 1992 durch Liang und Pardee eingeführt, hat sich die DD RT-PCR als effiziente Methode zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen erwiesen und zur Identifikation von mehr als einhundert spezifischen Genen geführt ([Liang and Pardee, 1995](#); [Matz and Lukyanov, 1998](#)). Die DD RT-PCR-Technik zeichnet sich aus durch

- relativ geringen Zeitaufwand für die Herstellung der cDNA-Fingerprints
- direkte Vergleichbarkeit von mehr als zwei Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Detektion von Transkripten mit geringer Kopienzahl pro Zelle (<10).

Grösstes Problem der Methode ist das Auftreten falsch positiver cDNA-Fragmente (50% und mehr), dementsprechend zeit- und kostenintensiv ist die Identifikation der richtig positiven Fragmente, wodurch der Vorteil des initial geringen Aufwandes relativiert wird. Das Ausgangsmaterial ist Gesamt-RNA der zu vergleichenden Populationen (BL60-2 ohne / nach Inkubation mit anti-IgM). Mögliche Fehlerquelle für spätere falsch positive cDNA's ist die Kontamination der RNA mit genomischer DNA, die durch Behandlung mit DNase I vermieden werden kann.

Die reverse Transkription (RT) wurde mit unspezifischen oligo-dT-Primern durchgeführt, die Einführung spezifischer Primer erfolgte während der anschliessenden PCR. Vorteile einer der RT-Einzelreaktion mit unspezifischen Primern sind neben Zeit- und Kostenersparnis eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Nachteile scheinen die verminderte Repräsentation von gering exprimierten Genen sowie stärkere Hintergrundsignale in den Fingerprints zu sein.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde initial mit spezifischen 5'-Primern (25 Nucleotide) und 3' Primern (30 Nukleotide) durchgeführt. Zur Reduktion falsch positiver Ergebnisse wurden jeweils zwei Amplifikationen pro Paar durchgeführt. Ausgehend vom exponentiellen Charakter der PCR wird deutlich, dass in diesem Teil der Methode die



grösste Fehlerquelle für falsch positive Ergebnisse liegt. Die PCR-Bedingungen sind entscheidend für den jeweiligen Fingerprint und dessen Reproduzierbarkeit. Die ersten 3 Zyklen der Reaktion wurden als low stringency PCR mit einer annealing-Temperatur von 40° durchgeführt, um möglichst alle Transkripte zu erfassen. Im Gegensatz zur Originalmethode wurde in den folgenden 25 Zyklen eine annealing-Temperatur von 60° benutzt, um die Spezifität zu erhöhen. Letztlich stellen die gewählten Bedingungen einen Kompromiss hinsichtlich Ausbeute und Spezifität dar.

Denaturierende Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung der [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP markierten cDNA-Fragmente benutzt, das entstandene Bandenmuster wird als cDNA-Fingerprint bezeichnet. Es wurden parallel jeweils zwei Ansätze von BL60-2-Zellen ohne bzw. nach Inkubation mit anti-IgM aufgetragen und nach Autoradiographie miteinander verglichen. Differentielle Banden wurden aus dem Gel eluiert.

Northern blot-Analysen wurden nach Klonierung und Sequenzierung differentieller Banden als Bestätigungstests durchgeführt. Gründe für falsch positive cDNA's, d.h. eine im Northern nicht zu bestätigende differentielle Expression, wurden in den vorangehenden Abschnitten diskutiert. Eine Möglichkeit zur effizienteren Bestätigung von differentieller Transkription stellen reverse Northern-Analysen dar. Dabei werden die DD RT-PCR-cDNA's auf zwei Filter geblottet und mit radioaktiv markierter cDNA, hergestellt aus mRNA der zu vergleichenden Populationen, inkubiert. Alternative Methoden zur Identifikation von differentiellen Transkripten sind die Ende der siebziger Jahre eingeführten Techniken der differentiellen und der subtraktiven Hybridisierung ([St. John and Davies, 1979](#)). Es handelt sich um qualitative Methoden, die relativ zeitaufwendig (mehrere Hybridisierungsrunden) und bezüglich der Ausbeute häufig nicht befriedigend sind. Eine Weiterentwicklung im Bereich der subtraktiven Methoden stellen PCR-basierte RDA (representational difference analysis)-Methoden dar ([Lisitsyn et al., 1993](#)).

Mit Abschluss des Human Genome Project stehen sämtliche menschliche Genssequenzen zur Verfügung. Im Mittelpunkt der Untersuchungen biologischer Systeme werden zukünftig neben einzelnen Genen vor allem die Expressionsmuster (mRNA, Proteine) von Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien oder unter unterschiedlichen Bedingungen stehen. In den vergangenen Jahren wurden Technologien entwickelt, die im weiteren Sinne zur Identifikation von differentiellen Transkripten beitragen können und mit deren Hilfe diese Suche weitaus effektiver als



bisher durchführbar ist: cDNA-Microarray-Hybridisierungen basieren wie Oligo-Nukleotid-Arrays auf der Immobilisierung von spezifischen DNA-Sequenzen auf Chips und erlauben die gleichzeitige Analyse mehrerer tausend Gene sowie eine kontinuierliche Verlaufsbeobachtung zellulärer Prozesse. Dazu werden cDNA's bekannter Gene, Expressed Sequence Tags oder Oligonukleotide auf Glas-Chips gebunden, mit Fluoreszenz-markierter cDNA inkubiert und anschliessend mit CCD-Kamera analysiert ([Schena et al.,1995](#); [Schena et al.,1998](#)). Es ist geplant, die Expression von Genen im Rahmen der IgM-vermittelten Apoptose mit cDNA-Microarray-Hybridisierungen weiter zu untersuchen und hierfür die bereits isolierten Fragmente der Differential-Display-Analyse zu verwenden.

Die Charakterisierung des Proteoms einer Zelle, d.h. der zu einem definierten Zeitpunkt vorhandenen Proteine, erfolgt in grösserem Massstab vor allem durch Zweidimensionale (2D) Gel-Elektrophorese. Wie sich gezeigt hat, erfolgt die Weiterleitung apoptotischer Signale in wesentlichen Teilen durch Modifikationen von Proteinen, insbesondere von Caspasen und deren Substraten. Daher ist die 2D-Gel-Elektrophorese zur Untersuchung dieser Prozesse sehr gut geeignet. Mit Hilfe dieser Methode wurde durch Rickers et. al. eine Reihe von Proteinen identifiziert (u.a. D4-GDI, hnRNP A1, C1, C3 sowie SP1), die spezifisch im Rahmen des anti-IgM vermittelten Zelltodes in B-Zellen modifiziert werden ([Rickers et al.,1998](#); [Brockstedt et al.,1998](#)).

DNA-Chip-Technologien und proteinchemischen Methoden besitzen ein grosses Potential bei der weiteren Aufklärung der IgM-induzierten Apoptose und anderer zellbiologischer Prozesse. Die Integration der gewonnenen Daten ermöglicht ein sehr viel genaueres Verständnis dieser Abläufe, als dies bisher möglich war. Daneben wird auch weiterhin die genaue biochemische Charakterisierung einzelner Proteine und die Analyse ihrer Interaktionen von Bedeutung sein.

## 4.5 Episomal stabile Genexpression in B-Zellen

### 4.5.1 Elektroporation von B-Zellen und Expression von EGFP

Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Etablierung eines Expressionssystems, das die Untersuchung von Kandidatengenomen durch Überexpression in B-Zellen ermöglicht. Als effektive und gut reproduzierbare Methode für den Gentransfer in B-Zellen gilt die Elektroporation. Die Testung der dabei erreichten Transfektionseffizienz in BL60-Zellen erfolgte mit Hilfe eines EGFP-Konstruktes, die Expressionsrate wurde durch FACS-Analyse gemessen.

Zunächst erfolgte nach einem Standardprotokoll die Elektroporation der B-Zellen mit einem EGFP-Konstrukt auf Basis des Vektors pRc/CMV, der eine transiente Expression von EGFP ermöglicht. Zur Optimierung der Transfektionsraten wurden verschiedene Parameter variiert (Temperatur, Zellzahl, DNA-Konzentration, Medium). Insbesondere die Erhöhung der DNA-Konzentration führte zu einer Steigerung der Expressionsrate, die dem Anteil EGFP-produzierender Zellen an der Gesamtzahl vitaler Zellen entspricht und deren Maximum bei 45% lag. Beim Einsatz hoher DNA-Mengen ( $> 10\mu\text{g}$ ) wurde neben der erhöhten Expressionsrate auch eine verstärkte Schädigung der elektroporierten Zellen beobachtet: die absolute Anzahl vitaler, EGFP-produzierender Zellen fällt somit nach einem Maximum wieder ab. Ursache ist wahrscheinlich der erhöhte Stromfluss, der zur Ausbildung grösserer Poren in der Zellmembran führt. Diese können sich nicht mehr vollständig schliessen, so dass die Zelle irreparabel geschädigt wird. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen ist Marker für den „Reinheitsgrad“ der transfizierten Zellpopulation, die Gesamtzahl der EGFP-produzierenden Zellen ist von Bedeutung für die nachfolgend benötigte Kultivierungsdauer. Die eingesetzte DNA-Konzentration stellt somit einen Kompromiss dar und ist von den anschliessend zu untersuchenden Prozessen abhängig. Neben der Expressionsrate wurden Dauer der EGFP-Expression sowie Wachstum und Vitalität der transfizierten Zellen untersucht. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen sank von initial 40% auf weniger als 5% nach 3 Tagen. Da das Wachstum der EGFP-transfizierten Zellen im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen konstant blieb, ist von einem Verlust des Plasmids im Verlauf mehrerer Zellteilungen und nicht vom Absterben der transfizierten Zellen auszugehen.

Die Expressionsrate von EGFP nach Elektroporation von pRc/CMV-EGFP in BL60-2 Zellen war mit 40% transfizierten Zellen ausreichend hoch. Da jedoch mit dem vorliegenden Konstrukt keine anhaltende Expression möglich war, wurde die EGFP-cDNA in den episomal stabilen Vektor pREP9 umklontiert. Nach Elektroporation der BL60-2 Zellen mit dem Vektor pREP9-EGFP (50 µg DNA) exprimierten ca. 50% der vitalen Zellen EGFP. Die Expressionsrate blieb über 14 Tage nahezu konstant und fiel danach leicht ab. Im Vergleich mit pREP9-Transfektanten konnten keine Unterschiede in Proliferationsgeschwindigkeit und Vitalität festgestellt werden.

Der verwendete Vektor pREP9 codiert u.a. für das EBNA1-Antigen und besitzt den Replikationsstart (oriP) des Epstein-Barr-Virus (EBV), so dass eine episomale Replikation des Vektors und damit eine relativ stabile Expression des Zielgens erfolgt. Ein Vorteil gegenüber retroviralen Vektoren ist neben dem geringeren labortechnischen Aufwand die fehlende Integration in das Genom der Zielzelle und der Ausschluss von Insertionsmutationen. Eine wesentliche Frage ist, ob EBNA-1 einen Einfluss auf die Proliferationsrate der zu transfizierenden BL60-Zellen besitzt. Im menschlichen Organismus wird EBNA-1 in ruhenden B-Zellen exprimiert. Für die Transformation bzw. Proliferation der Zellen sind weitere virale Proteine nötig, eine isolierte Wirkung von EBNA-1 auf die Zellproliferation ist sehr unwahrscheinlich. So wurde gezeigt, dass die Expression von EBNA-1 in EBV-negativen B-Zellen im Gegensatz zu anderen EBV-Proteinen keinen Einfluss auf die Expression von bcl-2 besitzt ([Finke,1992](#)).

#### **4.5.2 Selektion transfizierter Zellen**

Zur weiteren Erhöhung des Reinheitsgrades der transfizierten Zellpopulation wurden verschiedene Selektionsverfahren getestet. Die Anreicherung transfizierter Zellen erfolgte zunächst durch Inkubation mit G418 und Selektion über pREP9-codierte G418-Antibiotika-Resistenz. Dadurch konnte der Anteil EGFP-positiver Zellen in einem Zeitraum von 10 Tagen von 50% auf 60% gesteigert werden. Ein weiterer Anstieg ist nach längerer Inkubation mit G418 zu erwarten. Da jedoch die zu beobachtenden apoptotische Prozesse wesentlich früher abgeschlossen sind, ist eine Inkubationsdauer von mehr als 3 Tagen nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurde die Selektion pREP-9-transfizierter Zellen mit G418 nicht weiter verfolgt.

Einen alternativen Ansatz stellt die Aufreinigung über ein cotransfiziertes Oberflächenantigen und anschliessende magnetische Separation dar. Das CD4-Antigen wird vorwiegend in T-Helfer-Zellen exprimiert, nicht jedoch in B-Zellen, es kann also als Selektionsmarker für transfizierte B-Zellen eingesetzt werden. Die cDNA eines trunkierten CD4-Moleküls ( $\Delta$ CD4) ist in dem Vektor pMACS4 kodiert. Nach Transfektion von BL60-2 konnte die Expression von  $\Delta$ CD4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Da jedoch auch bei Einsatz grösserer Mengen Vektor-DNA die Expressionsrate unter 20% blieb und innerhalb von 3 Tagen stark abfiel, wurde die  $\Delta$ CD4-cDNA in den Vektor pREP9 kloniert. Nach Elektroporation der BL60-2-Zellen mit pREP9- $\Delta$ CD4 exprimierten ca.60% der Zellen das  $\Delta$ CD4-Molekül.

Zur magnetischen Separation der  $\Delta$ CD4-positiven Zellen wurde zunächst das MACSelect-System eingesetzt. Während der Inkubation der pREP- $\Delta$ CD4-Transfektanten mit anti-CD4-gekoppelten, magnetischen Partikeln (anti-CD4-beads) und der anschliessenden Waschschrte wurden die Transfektanten jedoch stark geschädigt. Die Ausbeute vitaler,  $\Delta$ CD4-positiver Zellen nach der Selektion blieb unbefriedigend. Am ehesten ist die Ursache hierfür in der Interaktion der Transfektanten mit den beads zu suchen: Transfektanten, die nicht mit den Partikeln inkubiert wurden, sonst jedoch nach Protokoll behandelt wurden, blieben vital. Da auch eine Änderung der Inkubationsbedingungen zu keiner wesentlich Besserung führte, wurde dieses System verlassen.

Ähnlich dem MACSelect-System beruht das Dynal-System auf Antikörper-gekoppelten, magnetischen Partikeln. Vorteil dieses Systems ist die Verfügbarkeit eines weiteren, löslichen Antikörpers, der gegen den Partikel-gebundenen CD4-Antikörper gerichtet ist und die Abtrennung der beads von den CD4-positiven Transfektanten erlaubt. Unter Verwendung anti-CD4-gekoppelter DYNAbeads konnte der Anteil  $\Delta$ CD4-exprimierender Zellen nach Transfektion, magnetischer Separation und nachfolgender Trennung der  $\Delta$ CD4-anti-CD4-Bindungen auf ca. 90% erhöht werden (FACS-Analyse nach 24 Stunden).

Zur Abschätzung der Expressionsrate eines kotransfizierten, zu analysierenden Proteins nach Selektion wurden BL60-2 Zellen mit den Konstrukten pREP9- $\Delta$ CD4 und pREP9-EGFP kotransfiziert und die  $\Delta$ CD4-positiven Zellen magnetisch aufgereinigt. Die nachfolgende Analyse der EGFP-Expression der selektionierten Zellen zeigte, dass ca. 80% der Zellen das EGFP-Molekül produzieren. Durch Anwendung der magnetischen

Separation nach Kotretransfektion konnte somit der Anteil der EGFP-produzierenden Zellen von ca. 50% auf ca. 80% erhöht werden. Für BL60-2-Zellen, die entweder mit pREP9- $\Delta$ CD4 oder mit pREP9-EGFP transfiziert wurden, konnte keine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden. Eine massive Behinderung der Proteinbiosynthese durch die codierten Proteine oder relevante Interaktionen mit weiteren zellulären Proteinen sind somit unwahrscheinlich, müssen jedoch bei der Beurteilung nachfolgender Experimente mit anderen Konstrukten auf Basis des pREP9-Vektors mit berücksichtigt werden.

Abschliessend erfolgt eine zusammenfassende Beschreibung der wichtigsten Charakteristika des Expressions- und Selektionssystems:

#### Teilschritte:

1. Cotransfektion von BL60-2-Zellen mit den Konstrukten pREP9- $\Delta$ CD4 und pREP-X (X entspricht dem zu analysierenden Protein) durch Elektroporation
2. Abtrennung toter Zellen durch FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation
3. Magnetische Separation  $\Delta$ CD4-positiver Transfektanten mit anschliessender Abtrennung der magnetischen Partikel von den  $\Delta$ CD4-positiven Zellen

#### Eigenschaften:

- Expression des Zielproteins in ca. 80% der selektionierten Zellen
- Dauer der Expression konstant über mindestens 10 Tage
- kein relevanter Einfluss auf Zellwachstum und –vitalität

Eine Weiterentwicklung des beschriebenen Expressionssystems insbesondere hinsichtlich einer kontrollierten Genexpression ist denkbar. Die kontrollierte Expression des zu analysierenden Genes erst nach der Selektion würde eine genauere Untersuchung der Auswirkungen dieses Genes auf die transfizierte Zelle ermöglichen. Ein episomal-stabiler Vektor, pCEP4-TetP, dessen Genexpression durch Tetracyclin regulierbar ist, wurde bereits beschrieben ([Jost et al., 1997](#)).

Das beschriebene Expressions- und Selektionssystem auf der Basis des pREP9-Vektors ermöglicht es, den Einfluss einer erhöhten Konzentration von Kandidatengenen in B-Zellen und anderen, CD4-negativen Zellen, zu analysieren. Für die Untersuchungen der IgM-vermittelten Apoptose in B-Zellen steht eine effiziente

Methode zur Verfügung, mit der die durch DD-RT PCR und 2D-Gelelektrophorese identifizierten Gene zuverlässig und schnell exprimiert und untersucht werden können.

## Literaturverzeichnis

- Adra, C.H., Zhu S., Ko, J.-L., Guillemot, J.-C., Cuervo, A.M., Kobayashi, H., Horiuchi, T., Lelias, J.-M., Rowley, J.D. and Lim, B. LPTM5: A novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells *Genomics* (1996) **35** 328-337
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature *Cell* (1996) **87** 171
- Alpy, F., Stoeckel, M.E., Dierich, A., Escola, J.M., Wendling, C., Chenard, M.P., Vanier, M.T., Gruenberg, J., Tomasetto, C. and Rio, M.C. The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-binding Protein *J Biol Chem* (2000) **276** 4261-4269
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. Basic local alignment search tool *J Mol Biol* (1990) **215** 403
- Bakshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. and Korsmeyer, S.J. Cloning of the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18 *Cell* (1995) **41** 899-906
- Bargou, R.C., Bommert, K., Weinmann, P., Daniel, P., Wagener, C., Mapara, M.Y. and Dörken, B. Induction of Bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis *Eur J Immunol* (1995) **25** 770-775
- Biederbick, A., Rose, S. and Elsasser, H.P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles *J Cell Sci* (1999) **112** 2473-84
- Blagoveshenskaya, A.D., Norcott J.P. and Cutler, D.F. Lysosomal targeting of p-selectin is mediated by a novel sequence within its cytoplasmic tail *J Biol Chem* (1998) **273** 2729-2739
- Bouchon, A., Krammer, P.H., and Walczak, H. Critical role for mitochondria in B cell receptor-mediated apoptosis *Eur J Immunol* (2000) **30** 69-77
- Brockstedt, E., Otto, A., Rickers, A., Bommert, K. and Wittmann-Liebold, B. Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line *J Protein Chem* (1999) **18** 225-231
- Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation *J Biol Chem* (1993) **268** 3037-3039
- Burrows, P.D. and Cooper, M.D. B cell development and differentiation *Curr Opin Immunol* (1997) **9** 239-244
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression *Science* (1994) **263** 802-805
- Cherqui, S., Kalatzis, V.V., Trugnan, G. and Antignac, C. The targeting of cystinosin to the lysosomal

membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif *J Biol Chem* (2001)

Cleary, M.L., and Sklar, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18 *Proc Natl Acad Sci* (1995) **82** 7439-7443

Cuervo, A.M. and Dice, J.F. Unique properties of lamp2a compared to other lamp isoforms *J Cell Sci* (2000) **113** 4441-4450

Cuervo, A.M., Hu, W., Lim, B. and Dice, J.F. I kappa B is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis *Mol Biol Cell* (1998) **9** 1995-2010

Davies, J.P., Chen, F.W. and Ioannou, Y.A. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein *Science* (2000) **290** 2295-2298

DeFranco, A.L. The complexity of signaling pathways activated by the BCR *Curr Opin Immunol* (1997) **9** 296-308

Doi, T., Motoyama, N., Tokunaga, A. and Watanabe, T. Death signals from the B cell antigen receptor target mitochondria, activating necrotic and apoptotic death cascades in a murine B cell line, WEHI-231 *Int Immunol* (1999) **11** 933-941

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition *Cell* (2000) **102** 33-42

Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans* *Cell* (1986) **44** 817-829

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature* (1998) **391** 43-50

Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D., Campbell, P.A. and Henson, P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells *J Immunol* (1992) **149** 4029-4035

Fernandes-Alnemri T., Litwack, G. and Alnemri E.S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 and mammalian interleukin-1beta-converting enzyme *J Biol Chem* (1994) **269** 30761-30764

Finke, J., Fritzen, R., Ternes, P., Trivedi, P., Bross, K.J., Lange, W., Mertelsmann, R. and Dolken, G. Expression of bcl-2 in Burkitt's lymphoma cell lines: induction by latent Epstein-Barr virus genes *Blood* (1992) **80** 459-469

Froelich, C.J., Dixit, M.D. and Yang, X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases *Immunol today* (1998) **19** 30-36

Gagliardini, V., Fernandez P.-A., Lee, R.K.K., Drexler, H.C.A., Rotello R.J., Fishman, M.C. and Yuan, J. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene *Science* (1994) **263** 826-828

Gromkowski, S.T., Brown, T.C., Cerutti, P.A. and Cerottini, J.C. DNA of human Raji target cells is damaged upon lymphocyte-mediated lysis *J Immunol* (1986) **136** 752-756



- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis *Genes Dev* (1999) **13** 1899
- Hart, S.P., Haslett, C. and Dransfield, I. Recognition of apoptotic cells by phagocytes *Experientia* (1996) **52** 950-956
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. and Horvitz, H.R. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death *Nature* (1992) **356** 494-499
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis *Nature* (2000) **407** 770-776
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2 *Cell* (1994) **76** 665-676
- Hunziker, W. and Geuze, H. J. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins *BioEssays* (1996) **18** 379-389
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. Programmed cell death in animal development *Cell* (1997) **88** 347-354
- Jost, M., Kari, C., and Rodeck, U. An episomal vector for stable tetracycline-regulated gene expression *Nucl Acid Research* (1997) **25** 3131-3134
- Kannan, K., Divers, S.G., Lurie, A.A., Chervenak, R., Fukuda, M. and Holcombe, R.F. Cell surface expression of lysosome-associated membrane protein-2 (lamp2) and CD63 as markers of *in vivo* platelet activation in malignancy *Eur J Haematol* (1995) **55** 145-151
- Kannan, K., Stewart, R. M., Bounds, W., Carlsson, S. R., Fukuda, M., Betzing, K. W., and Holcombe, R. F. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium *Cell Immunol* (1996) **171** 10-19
- Kerr, J.F.R, Wyllie, A.H. and Currie, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer* (1972) **26** 239-257
- Kerr, J.F.R. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes *J Path Bact* (1965) **90** 419-427
- Kleijmeer, M.J., Morkowski, S., Griffith, J.M., Rudensky, A.Y. and Geuze, H.J. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments *J Cell Biol* (1997) **139** 639-649
- Konecki, D. S., Foetisch, K., Zimmer, K. P., Schlotter, M., and Lichter-Konecki, U. An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner *Biochem Biophys Res Commun* (1995) **215** 757-767
- Krammer, P.H. CD95's deadly mission in apoptosis *Nature* (2000) **407** 789-795
- Kroczeck, R.A. Southern and Northern analysis *J Chromat* (1993) **618** 133-145

- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S.-S. and Flavell, R.A. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 $\beta$  converting enzyme *Science* (1995) **267** 2000-2003
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R.A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice *Nature* (1996) **384** 368-372
- Liang, P. and Pardee, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction *Science* (1992) **257** 967-970
- Liang, P. and Pardee, A. P. Recent advances in differential display *Curr Opin Immunol* (1995) **7** 274-280
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, N. Cloning the differences between two complex genomes *Science* (1993) **259** 946
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c *Cell* (1996) **86** 147-157
- Liu, Y.-J., deBouteiller, O. and Fugier-Vivier, I. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers *Curr Opin Immunol* (1997) **9** 256-262
- Mancini, G.M., Havelaar, A.C. and Verheijen, F.W. Lysosomal transport disorders *J Inherit Metab Dis* (2000) **23** 278-292
- Mathews, P.M., Martinie, J.B. and Fambrough, D.M. The pathway and targeting signal for delivery of the integral membrane glycoprotein LEP100 to lysosomes *J Cell Biol* (1992) **118** 1027-1040
- Matiba, B., Mariani, S.M. and Krammer, P.H. The CD95 system and the death of a lymphocyte *Sem Immunol* (1997) **9** 59-68
- Matz, V.M. and Lukyanov, S.A. Different strategies of differential display: areas of application *Nucl Acid Res* (1998) **26** 5537-5543
- McCormack, J.E., Pepe, V.H., Kent, R.B., Dean, M., Marshak, A. and Sonenshein, G.E. Specific regulation of c-myc oncogene expression in a murine B-cell lymphoma *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81** 5546-5550
- Nagase, T., Miyama, N., Tanaka, A., Sazuka, T., Seki, S., Sato, S., Tatabata, S., Ishikawa, K., Kawarabayashi, Y., Kotani, H. et. al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes . III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by the analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 *DNA Research* (1995) **2** 37-43
- Nagata, S. Apoptosis by death factor *Cell* (1997) **88** 355-365
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases *Trends Biochem Sci* (1997) **22** 299-306
- Osmond, D.G., Rolink, A. and Melchers, F. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model *Immunol Today* (1998) **19** 65-68

- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein *Gene* (1992) **111** 229-233
- Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system *Nature* (1996) **381** 751-758
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site *Science* (1993) **259** 1157-1161
- Rich, T., Watson, C. J., Wyllie, A. Apoptosis: the germs of death *Nature Cell Biol* (1999) **1** E69-E71
- Rickers, A., Brockstedt, E., Mapara, M.Y., Otto, A., Dörken, B., and Bommert, K. Inhibition of CPP32 blocks surface IgM-mediated apoptosis and D4-GDI cleavage in human BL60 Burkitt lymphoma cells *Eur J Immunol* (1998) **28** 296-304
- Rotin, D., Bar-Sagi, D., O Brodovich, H., Merilainen, J., Lehto, V.P., Canessa, C.M., Rossier, B.C. and Downey, G.P. An SH3-binding region in the epithelial Na-Channel ( $\alpha$ -rENAC) mediates its localization at the apical membrane *EMBO J* (1994) **13** 4440-4450
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd ed. Plainview, NY CSHL Press 1989
- Savill, J. and Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death *Nature* (2000) **407** 784-788
- Schena, M., Heller, R. A., Thériault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E. and Davis, R. W. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics *Trends Biotechnol* (1998) **16** 301-306
- Schena, M., Shalon, D., Davies, R.W. and Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray *Science* (1995) **270** 467-470
- Scott, D.W. Apoptosis in immature B lymphocytes *Apoptosis and the immune response* 187-215 Wiley-Liss (1995)
- Scott, L.M., Mueller, L. and Collins, S.J. E3, a hematopoietic-specific transcript directly regulated by the retinoic acid receptor  $\alpha$  *Blood* (1996) **88** 2517-2530
- St. John, T.P., and Davis, R.W. Isolation of galactose-inducible DNA sequences from *Saccharomyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridization *Cell* (1979) **16** 443-452
- Tan, X. and Wang, Y.J The caspase-Rb connection in cell death *Trends Cell Biol* (1998) 116-120
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M.L., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice *Nature* (2000) **406** 902-906
- Tata, J.R. Requirement for RNA and Protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture *Dev Biol* (1966) **13** 77-82
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes *Nature* (1992) **356** 768-774

Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forrestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W., and Antignac, C. A novel gene encoding an integral membrane proteine is mutated in nephropathic cystinosis *Nature Genet* (1998) **18** 319-324

Veis, D.J., Sorensen, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair *Cell* (1993) **75** 229-240

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian potein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins *Cell* (2000) **102** 43-53

Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula N., Beerens, C.E.M.T., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J. and Mancini, G.M.S. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases *Nature Genet* (1999) **23** 462-465

Weinmann, P., Bommert, K., Mapara, M.Y., Dörken, B. and Bargou, R.C. Overexpression of the death promoting gene bax-alpha sensitizes human BL-41 Burkitt lymphoma cells towards surface IgM-mediated apoptosis *Eur J Immunol* (1997) **27** 2466-2468

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. Genetic control of programmed cell death in Drosophila *Science* (1994) **264** 677-683

Wilson, K.P., Black, J.-A.F., Thompson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. and Livingston, D.J. Structure and mechanism of interleukin-1beta converting enzyme *Nature* (1994) **370** 270-275

Wolf, B.B. and Green, D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases *J Biol Chem* (1999) **274** 20049-20052

Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation *Nature* (1980) **284** 555-556

Xue, D., and Horvitz, H.R. Inhibition of the Caenorhabditis elegans cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* (1995) **377** 248-251

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme *Cell* (1993) **75** 641-652

Zhang, F., Zhang, W., Liu, L., Fisher, C.L., Hui, D., Childs, S., Dorovini-Zis, K. and Ling, V. Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes *J Biol Chem* (2000) **275** 23289-23294

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 *Cell* (1997) **90** 405-413

**Abkürzungsverzeichnis**

	2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
	$\Delta$ CD4	trunkiertes CD4-Molekül
<b>A</b>	APAF	apoptosis protease-activating factor
	ATP	Adenosintriphosphat
	BCL	B cell lymphoma protein
	BCR	B cell receptor
	BL60-2	Burkitt-Lymphom-Zelllinie
	BLK	Protein-Tyrosinkinase
	BTK	Proteinkinase
<b>C</b>	C.elegans	Caenorhabditis elegans
	CAD	caspase-activated DNase
	Caspase	cysteinyll aspartate-specific proteinases
	CD	cluster of differentiation
	CED	C. elegans death genes
	c-FOS	Transkriptionsfaktor
	c-MYC	Transkriptionsfaktor
	CPP32	Synonym: Caspase 3
	CREB	CRE (cAMP responsive element) -binding protein
	CrmA	cytokine response modifier A
	CTL	cytotoxic T lymphocytes
<b>D</b>	D4-GDI	D4-GDP dissociation inhibitor
	DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
	DD	differential display
	DFF45	DNA fragmentation factor
	DNase	deoxyribonuclease
	ds	double strand
	DED	death effector domain
	DISC	death inducing signal complex

<b>E</b>	E1B	adenovirus early antigen 1B
	EBNA	Epstein Barr virus nuclear antigen
	EBV	Epstein-Barr-Virus
	EGFP	enhanced green fluorescent protein
	EST	expressed sequence tag
<b>F</b>	FAS	Synonyme: CD95, APO1
	FACS	fluorescence activated cell sorter
	FLICE	FADD-like ICE
	FAS-L	FAS-Ligand
<b>G</b>	GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
	GFP	green fluorescent protein
<b>H</b>	HEL	Humane Erythroleukämie-Linie
	HID	head involution defective protein (D. melanogaster)
	hnRNP	heterogeneous ribonucleoparticals
	HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
<b>I,</b>	IAP	inhibitor of apoptosis-protein
<b>J</b>	ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
	ICE	interleukin-1-beta-converting enzyme
	IgM	Immunglobulin M
	IL1-beta	Interleukin1-beta
	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
	ITAM	immunoreceptor based activation motif
	JNK	Jun-Kinase
<b>K,</b>	LAPTM5	lysosomal associated protein, transmembrane 5
<b>L</b>	Lsg.	Lösung
<b>M</b>	MALT	mucosa associated lymphatic tissue
	MAPK	mitogen-activated protein kinase
	MEKK1	MAP-Kinase-Kinase
	MTN	multiple tissue northern

---

<b>N</b>	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
	NLS	nuclear localization sequence
	NFAT	nucleus factor AT
	NP40	Octylphenoxy-polyethoxy-ethanol
	NCBI	The National Center for Biotechnology Information
<b>O</b>	oligo-dT	Oligodeoxytrinukleotid
	OD	Optische Dichte
<b>P</b>	PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
	PBL	periphal blood lymphocytes
	PBS	phosphate buffered sialine
	PCD	Programmierter Zelltod, Synonym: Apoptose
	PI	propidium iodide
	PS	Phosphatidylserin
	PT	permeability transition
<b>R</b>	RAS	GTPase
	Rb	Retinoblastom-Protein
	Rho-GTPase	Rho-Guanintrinukleotid-Phosphatase
	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<b>S</b>	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	SYK	Protein-Tyrosin-Kinase
<b>T</b>	TAE	Tris Acetat EDTA
	TaqPol	Thermus aquaticus-Polymerase
	TBE	Tris Borat EDTA
	TCR	T cell receptor
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
	TFB	transformation buffer
	TNF/ TNFR1	tumor necrosis factor / tumor necrosis factor receptor 1
<b>U,V</b>	U1snRNP	U1 small nuclear ribonucleoprotein partical
	UV	Ultraviolettes Licht

<b>W</b>	w/w	weight per weight
	w/v	weight per volume
<b>X,Y</b>	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Einteilung der Caspasen	7
<b>Tabelle 2:</b> Substrate der Caspasen	10
<b>Tabelle 3</b> Auswertung der Sequenzierungen ausgewählter DD RT-PCR-Fragmente	52
<b>Tabelle 4</b> Einteilung endosomaler und lysosomaler Kompartimente in B-Zellen.	62



**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1</b>	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von BL60-Zellen	3
<b>Abbildung 2</b>	Fas-Signaltransduktion	4
<b>Abbildung 3</b>	Signaltransduktion Apoptose	14
<b>Abbildung 4</b>	Übersicht der Vorarbeiten	31
<b>Abbildung 5</b>	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	35
<b>Abbildung 6</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme	49
<b>Abbildung 7</b>	Elektrophoretische Auftrennung von DD RT-PCR-Fragmenten	50
<b>Abbildung 8</b>	Beispiel für Kontrollverdau nach Klonierung	51
<b>Abbildung 9</b>	Differentielle Hybridisierung von LPTM5	55
<b>Abbildung 10</b>	Western Blot-Analyse LPTM5	56
<b>Abbildung 11</b>	Expressionsmuster von LPTM5. Multiple Tissue Northern	57
<b>Abbildung 12</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	58
<b>Abbildung 13</b>	FACS-Analyse von LPTM5	59
<b>Abbildung 14</b>	Membranständige Lokalisation von LPTM5	60
<b>Abbildung 15</b>	Immunpräzipitation von LPTM5	61
<b>Abbildung 16</b>	Elektronenmikroskopische Lokalisation von LPTM5	62
<b>Abbildung 17</b>	Elektronenmikroskopische Lokalisation nach Inkubation mit anti-IgM	63
<b>Abbildung 18</b>	Expression von pRc/CMV-EGFP, Fluoreszenzmikroskopie	66
<b>Abbildung 19</b>	Expression von pRc/CMV-EGFP, FACS-Analyse	67
<b>Abbildung 20</b>	pREP9-EGFP-Konstrukt, Kontrollrestriktion	67
<b>Abbildung 21</b>	Expression von pREP9-EGFP	68
<b>Abbildung 22</b>	G418-Sensitivität von BL60-2-Zellen	69
<b>Abbildung 23</b>	G418-Selektion von BL60-2-Zellen nach Transfektion	70
<b>Abbildung 24</b>	Expression von CD4 / $\Delta$ CD4 ( Transfektion pMACS4), FACS-Analyse	71
<b>Abbildung 25</b>	Expression von $\Delta$ CD4 ( Transfektion pREP9- $\Delta$ CD4), FACS-Analyse	72
<b>Abbildung 26</b>	DYNAL-Aufreinigung pREP9- $\Delta$ CD4-transfizierter Zellen	73
<b>Abbildung 27</b>	Cotransfektion von pREP9-EGFP und pREP9- $\Delta$ CD4, Selektion	73
<b>Abbildung 28</b>	Modell für die Orientierung des C-Terminus von LPTM5	82

## Danksagung

Die Anfertigung einer Doktorarbeit stellt eine komplexe Aufgabe dar, deren Realisierung nur mit vielfältiger Unterstützung möglich ist. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken möchte ich danken für das Promotionsthema, die hervorragenden Rahmenbedingungen sowie die Möglichkeit, an internationalen Fachkongressen teilzunehmen.

Ich danke Dr. Kurt Bommert, der mich als Laborleiter umfassend betreute und mir grundlegende Arbeitsweisen beibrachte, immer wieder Anregungen gab und der mir sein Wissen, vor allem in experimentellen Detailfragen und an biologischen Konzepten, jederzeit interessant vermitteln konnte.

Andreas Laubersheimer hat mich in die Thematik eingeführt und mit der Etablierung und Durchführung der Differential-Display-Methode die Voraussetzung für diese Arbeit geschaffen. Sein Interesse an der Arbeit hat mich durch alle Phasen begleitet und mich vielfach motiviert.

Für vielschichtige Gespräche und menschliches wie auch fachliches Interesse danke ich Anke Rickers, Anja Schröder, Franziska Jundt, Ina Krukenberg, Ulrike Steinhusen, Ute Nitschke sowie Dirk Höhnemann, Jan Schwenkenbecher, Patrick Seibert, Claus Reimertz und Stephan Bergmann aus der Forschungsgruppe von Prof. Dörken. Meinen Eltern danke ich für die zuverlässige Unterstützung, die mir u.a. das Studium und diese Arbeit ermöglichte.

**Lebenslauf**

**Name:** Hauke Schneider  
**Geburtsdatum:** 26.09.1973  
**Geburtsort:** Halle an der Saale  
**Wohnort:** Berlin

**Schulbildung:**

09.1980 – 08.1988 Oberschule Berlin-Pankow  
09.1988 – 08.1990 Sportschule Berlin-Köpenick  
09.1990 – 06.1992 Gymnasium Carl v. Ossietzky, Berlin-Pankow  
07.1992 – 06.1993 Wehrdienst als Sanitäter  
07.1993 – 09.1993 Praktikum am EPCOT Center, Orlando, USA

**Studium und ärztliche Ausbildung:**

10.1993 – 11.2000 Studium Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin  
09.1995 Ärztliche Vorprüfung, Note „gut“  
Forschungsjahr (Promotion) in der Forschungsgruppe Prof. Dr. med. B. Dörken, Charité Berlin, Robert-Rössle-Klinik am Max-Delbrück-Centrum Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie Onkologie und Tumorimmunologie  
11.2000 Drittes Staatsexamen, Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung „gut“  
04.2001 Arzt im Praktikum, Neurologische Klinik der Universität Carl Gustav Carus, Dresden,  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Reichmann

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Hauke Schneider

Berlin, im August 2001